

Analyse von Interaktionen des Hepatoma-derived growth factors (HDGF)

**Identifizierung und Charakterisierung eines HDGF
enthaltenden Ribonukleo-Protein-Komplexes**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer.nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Stephanie Bremer

aus

Siegen

Bonn 2011

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Gutachter: Prof. Dr. Volkmar Gieselmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Christa Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Februar 2012

Erscheinungsjahr: 2012

Meiner Familie

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ARE	Adenosin und Uracil-reiches Element
AS	Aminosäuren
Bcl-2	B-Zell Lymphoma 2
BN	Blau Nativ
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	„copy“ Desoxyribonukleinsäure
cds	Kodierende Sequenz
DAPI	4',6-Diamidin-Phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKcs	Katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase
DTT	Dithiothreitol
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisierung
FASP	Filter-basierte Probenvorbereitung
FCS	Fötales Kälberserum
GST	Glutathion-S-Transferase
HATH	Homolog zum Aminoterminus von HDGF
HDGF	Hepatoma-derived growth factor
HMG	High Mobility Group
HRP	HDGF-verwandte Proteine
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LC	Flüssigkeitschromatographie

Abkürzungsverzeichnis

Lsg.	Lösung
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
NLS	Nukleäre Lokalisationssequenz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PTM	Posttranslationale Modifikation
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEAP	Sekretierte Alkalische Phosphatase
SFPQ	Prolin und Glutamin-reicher Spleiß-Faktor
SILAC	Stable isotope labeling with amino acids in cell culture
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Saline
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
UTR	Untranslatierte Region
VL	Volllängen mRNA von Bcl-2
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
Inhaltsverzeichnis	11
Abbildungsverzeichnis	17
1 Einleitung	21
1.1 Proteomik	21
1.1.1 Proteom	21
1.1.2 Protein-Protein Interaktionen allgemein	21
1.1.3 Methoden zur Analyse von Protein-Protein Interaktionen	23
1.1.4 Strep-tag	25
1.2 Hepatoma-derived growth factor (HDGF)	27
1.2.1 Allgemeines	27
1.2.2 HDGF und Proteomik	30
1.3 Ziel der Arbeit	33
2 Material	35
2.1 Verbrauchsmaterialien	35
2.2 Chemikalien	36
2.3 Allgemeine Lösungen und Puffer	37
2.4 Chemisch kompetente Zellen	40
2.5 Zellkulturmedien	41
2.6 Zelllinien	41
2.7 Primer	41
2.8 Plasmide	42
2.9 Antikörper	44
2.10 Größenstandards	45
2.11 Geräte	46

3 Methoden	49
3.1 Molekularbiologische Techniken.....	49
3.1.1 Allgemeines	49
3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA.....	49
3.1.3 Präparation von RNA aus Zellen	49
3.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	50
3.1.5 Saure Ethanolfällung.....	51
3.1.6 Spaltung von Plasmid-DNA	51
3.1.7 Auftrennung von DNA in Agarosegelen	51
3.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	52
3.1.9 Reverse Transkription.....	52
3.1.10 Polymerase-Ketten-Reaktion	53
3.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten	55
3.1.12 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterien.....	55
3.1.13 Zyklische Sequenzierung.....	56
3.1.14 Quantitative RT-PCR	56
3.2 Zellkultur	57
3.2.1 Kultivierung von Zellen.....	57
3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	57
3.2.3 Teilen von Zellen.....	57
3.2.4 Zählen von Zellen	58
3.2.5 Transfektion von eukaryontischen Zellen	58
3.3 Biochemische Arbeiten	59
3.3.1 Herstellung von Zelllysaten.....	59
3.3.2 Proteinbestimmung	59
3.3.3 Behandlung von Zelllysaten mit RNase A	60

3.3.4	SDS-PAGE	60
3.3.5	Blau-Native Gelelektrophorese (BN-PAGE)	61
3.3.6	Western Blot nach dem Semi-Dry Verfahren	61
3.3.7	Coomassie Färbung von SDS-Gelen	62
3.3.8	Immunfluoreszenzfärbung von Proteinen in Zellen	62
3.3.9	Affinitäts-Aufreinigung von Strep-tag Fusionsproteinen	64
3.3.10	Aufreinigung über Strep-Tactin MacroPrep Z-Säulen	65
3.3.11	Aufreinigung über Strep-Tactin Sepharose und MacroPrep Beads	65
3.3.12	Größenausschlusschromatographie	65
3.4	Massenspektrometrische Analysen	66
3.4.1	Probenvorbereitung	66
3.4.2	FASP-Methode	67
3.4.3	Nano-LC	69
3.4.4	MS2 Analyse ESI-Ionenfalle	69
3.4.5	Daten-Analyse	70
4	Ergebnisse	71
4.1	Untersuchungen zu HDGF-Proteinkomplexen	71
4.1.1	Untersuchung von HDGF-Proteinkomplexen mittels Größenausschlusschromatographie	71
4.1.2	Untersuchung von HDGF-Proteinkomplexen mittels Blau-Nativer-Gelelektrophorese	75
4.2	Aufreinigung der HDGF-Proteinkomplexe über Strep-Tactin Matrices	76
4.3	Identifizierung der Interaktionspartner von HDGF	79
4.3.1	Massenspektrometrische Identifizierung von HDGF- Interaktionspartnern	79
4.3.2	Verifizierung der mit Massenspektrometrie identifizierten Kandidaten mittels Western Blot	84

4.4 Untersuchungen zur Interaktion von HDGF und Nukleolin	85
4.4.1 Immunzytochemische Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von HDGF und Nukleolin	85
4.4.2 Untersuchung der Koreinigung von Nukleolin in Abhängigkeit der HDGF NLS 2-Variante	90
4.4.3 Abhängigkeit der HDGF-Nukleolin-Interaktion von RNA	91
4.5 Untersuchungen zum Einfluss von Bcl-2 auf die Interaktion von HDGF und Nukleolin	94
4.5.1 Einfluss der Überexpression von HDGF auf die Expressionshöhe von Bcl-2 auf mRNA und Proteinebene	94
4.5.2 Untersuchung der Interaktion von HDGF und Nukleolin in Abhängigkeit verschiedener Bcl-2 Konstrukte in HeLa-Zellen	97
4.5.3 Untersuchung der Zusammensetzung der Eluate von Bcl-2 cds und mRNA mit Hilfe der MaxQuant Analyse	103
4.5.4 Interaktions-Muster von HDGF in Abhängigkeit verschiedener Phosphomutanten	105
5 Diskussion	107
5.1 HDGF-Proteinkomplexe	107
5.2 Untersuchungen zu HDGF und Nukleolin	112
5.3 Untersuchungen zu HDGF und Nukleolin in Abhängigkeit von Bcl-2	116
5.4 Bedeutung der identifizierten Interaktionspartner im Hinblick auf mögliche Funktionen von HDGF	121
6 Zusammenfassung	125
7 Literatur	127
8 Anhang	137
8.1 Massenspektrometrie	137
8.1.1 Mascot Report-Listen der identifizierten Proteine aus der tryptischen Spaltung von Proteinen aus SDS-Gelen	137

8.1.2 Mascot Report-Listen der Proteine aus der direkten tryptischen Spaltung von Proteinen der Eluat-Fraktionen	150
8.1.3 Mascot Report-Listen der identifizierten Proteine aus der tryptischen Spaltung von Proteinen aus dem SDS-Gel der Phosphomutanten von HDGF	179
8.1.4 Liste der Proteine aus der Untersuchung der Eluate von HDGF Strep-tag mit Bcl-2 cds und VL in der LTQ-Orbitrap	193
8.2 Kontrolle der Gesamt-RNA für die quantitative Real-time PCR	194
8.3 Vektorkarten	195
Erklärung.....	197
Danksagung	199
Lebenslauf	201

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Beispiel für die Durchführung einer Proteom-Analyse zur Identifizierung von Proteinkomplexen.	22
Abbildung 1-2: Prinzip der Strep-tag Aufreinigung.	27
Abbildung 1-3: Aufbau und Struktur der Mitglieder der HDGF-Proteinfamilie. ...	28
Abbildung 4-1: Größenbestimmung von endogenen HDGF-Proteinkomplexen.	72
Abbildung 4-2: Größenbestimmung von HDGF Strep-tag Proteinkomplexen. ...	74
Abbildung 4-3: Blau-Native-Gelelektrophorese von HeLa und HEK 293-Zellysaten.	76
Abbildung 4-4 : Aufreinigung von HDGF Strep-tag Fusionsprotein über verschiedene Matrices.	78
Abbildung 4-5: Verifizierung der Aufreinigung von HDGF Strep-tag mittels Western Blot.	79
Abbildung 4-6: Ergebnisse der LC-MS Analyse tryptisch gespaltener Proteine aus Gelbanden von HDGF- und Kontroll-Eluat-Fractionen.	81
Abbildung 4-7: Identifizierung von Nukleolin und Ku86 im Western Blot.	85
Abbildung 4-8: Immunzytochemische Untersuchung zur Lokalisation von endogenem HDGF und Nukleolin.	86
Abbildung 4-9: Immunzytochemische Untersuchung zur Lokalisation von transfiziertem HDGF und endogenem Nukleolin.	87
Abbildung 4-10: Lokalisation von Nukleolin in Abhängigkeit von HDGF WT und einer NLS 2-Mutante.	88
Abbildung 4-11: Statistische Auswertung der Lokalisation von Nukleolin in Abhängigkeit von HDGF in HeLa-Zellen.	90
Abbildung 4-12: Koreinigung von Nukleolin in Abhängigkeit der NLS 2-Mutante von HDGF.	91
Abbildung 4-13: Einfluss von RNase A auf den Proteinkomplex von HDGF und Nukleolin.	92

Abbildung 4-14: Destabilisierung des HDGF-Nukleolin Proteinkomplexes durch Paclitaxel.....	94
Abbildung 4-15: Expressionsanalyse von Bcl-2 auf mRNA und Protein-Ebene in Abhängigkeit von HDGF.	96
Abbildung 4-16: Schematische Darstellung und Expression der Bcl-2 Konstrukte.....	98
Abbildung 4-17: Quantifizierung der HDGF-Expression in Abhängigkeit verschiedener Bcl-2 Konstrukte.	99
Abbildung 4-18: Abhängigkeit der Interaktion von HDGF und Nukleolin von der Bcl-2 mRNA.	101
Abbildung 4-19: Einfluss der kodierenden Sequenz von Bcl-2 auf die Koreinigung von Nukleolin und HDGF.	102
Abbildung 4-20: Untersuchung der Proteinzusammensetzung der Eluate von HDGF Strep-tag mit der Bcl-2 cds oder VL mRNA.	104
Abbildung 4-21: Analyse der Phosphomutanten von HDGF.....	106
Abbildung 8-1: Mascot-Report für Ku86.....	138
Abbildung 8-2: Mascot-Report für Nukleolin.	141
Abbildung 8-3: Mascot-Report für PARP-1.....	144
Abbildung 8-4: Mascot-Report für DNA-PKcs.....	147
Abbildung 8-5: Mascot-Report HDGF Strep-tag Eluat 1.	150
Abbildung 8-6: Mascot-Report HDGF Strep-tag Eluat 2.....	155
Abbildung 8-7: Mascot-Report HDGF Strep-tag Eluat 3.....	160
Abbildung 8-8: Mascot-Report Kontroll-Eluat (Leervektor) 1.	165
Abbildung 8-9: Mascot-Report Kontroll-Eluat (Leervektor) 2.	170
Abbildung 8-10: Mascot-Report Kontroll-Eluat (Leervektor) 3.	175
Abbildung 8-11: Mascot-Report für Histon H2B.....	179
Abbildung 8-12: Mascot-Report für Histon H4.	183
Abbildung 8-13: Mascot-Report für Histon H2A.....	185
Abbildung 8-14: Analyse der Gesamt-RNA für die Real-time PCR.	194

1 Einleitung

1.1 Proteomik

1.1.1 Proteom

Das Forschungsgebiet der Proteomik beschäftigt sich mit der Analyse von Proteomen. Unter dem Begriff Proteom versteht man alle Proteine, die von einem Genom, einer Zelle oder einem Gewebe unter definierten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt gebildet werden (Deutsche Gesellschaft für Proteomforschung (DGPF)). Darunter wird unter anderem die Klärung der Identität von Proteinen, die Bestimmung von Primärsequenzen unbekannter Proteine, die Untersuchung posttranslationaler Modifikationen (PTM) sowie die Quantifizierung von Proteinen in unterschiedlichen Zuständen verstanden¹. Die Voraussetzung für das Verständnis ganzer Proteinnetzwerke ist die Analyse von Protein-Protein Interaktionen. Diese übergreifenden Erkenntnisse bieten dann die Möglichkeit, einzelne Proteine mit bislang unbekannter Funktion in größere funktionelle Zusammenhänge zu setzen.

1.1.2 Protein-Protein Interaktionen allgemein

Betrachtet man das Genom verschiedener Organismen, wird deutlich, dass ihre unterschiedliche Komplexität nicht alleine auf der Ebene der Gene erklärt werden kann. Der Anzahl der Gene des humanen Genoms (ca. 30.000) stehen über 32.000 Gene der Maispflanze (*Zea mays*) gegenüber². Die Taufliege (*Drosophila melanogaster*) wartet mit immer noch 13.000 Genen auf, die Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) besitzt noch 6000 Gene^{3,4}. Statistische Untersuchungen zum Interaktom, worunter man die Gesamtheit von Protein-Interaktionen versteht, zeigte jedoch, dass im Menschen ca. 650.000 Protein-Wechselwirkungen vorhergesagt werden, wohingegen für den Hefeorganismus nur ca. 30.000 dieser Wechselwirkungen berechnet wurden⁵. Die Gründe für Unterschiede in der Komplexität von Organismen können daher

nur auf Proteinebene gesucht werden. Dies entspricht auch deshalb den Erwartungen, da Proteinkomplexe an fast allen wichtigen zellulären Vorgängen beteiligt sind. Dazu zählen die elementaren Vorgänge in einer Zelle wie DNA-Replikation, Transkription, Translation und Zellzykluskontrolle ebenso wie Signaltransduktion und Sekretion. Neben großen, gut untersuchten Proteinkomplexen wie dem Spleißosom⁶, dem Ribosom⁷ oder dem Nukleären Poren-Komplex⁸, ist die größte Anzahl der Proteinkomplexe jedoch meist von transienter Natur. Neben Interaktionen kann auch die Modifizierung von Proteinen transient sein, z.B. die Phosphorylierung durch Proteinkinasen oder die Dephosphorylierung durch Phosphatasen. Des Weiteren werden transiente Protein-Interaktionen für die Bildung von Transkriptionskomplexen, die korrekte Faltung von Proteinen oder dem Transport von Proteinen durch Membranen benötigt. Da jedoch zunächst die Konditionen, unter denen es zur Bildung der transienten Proteinkomplexe kommt, bekannt sein müssen, sind diese Proteinkomplexe sehr viel schwieriger zu isolieren⁹. Durch die Weiterentwicklung im Bereich der Proteomforschung und insbesondere der Massenspektrometrie stehen heute Methoden zur Verfügung, die eine Detektion hochmolekularer Proteinkomplexe ermöglichen, die nur zu geringen Anteilen in der Zelle vorliegen. Ein vereinfachtes schematisches Beispiel für die Anreicherung, Detektion und Analyse von Proteinkomplexen im Rahmen einer Proteom-Studie ist in Abbildung 1-1 dargestellt.

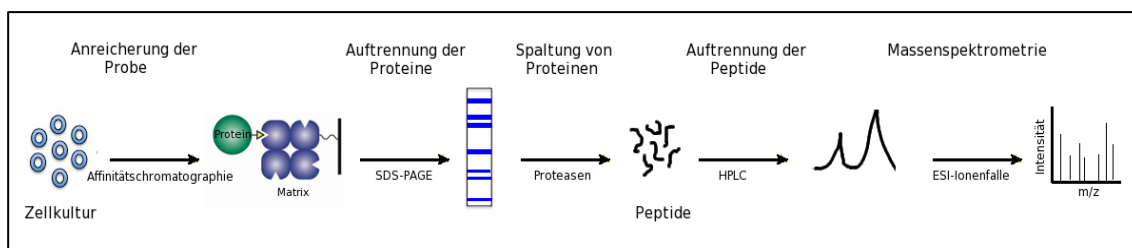


Abbildung 1-1: Beispiel für die Durchführung einer Proteom-Analyse zur Identifizierung von Proteinkomplexen.

Die Proteine von Interesse werden zunächst in einem hochselektiven Schritt aus der Ausgangsprobe angereichert. Für den Schritt der Anreicherung ist hier exemplarisch die Affinitätschromatographie dargestellt. Anschließend erfolgt in der Regel die Auftrennung der Proteine, die z.B. durch eine elektrophoretische Trennung (SDS-PAGE) erreicht wird. Die aufgetrennten Proteine werden anschließend durch Proteasen gespalten und die erzeugten

Peptide über chromatographische Methoden wie der HPLC aufgetrennt. Die Analyse der Peptide erfolgt dann mit Hilfe eines Massenspektrometers.

1.1.3 Methoden zur Analyse von Protein-Protein Interaktionen

Da das bzw. die Proteine von Interesse in den meisten Fällen nur einen sehr geringen Anteil am Gesamtproteingehalt einer Probe ausmachen, muss zunächst eine hochselektive Anreicherung und Auftrennung gegenüber dem restlichen Zellmaterial erfolgen^{9,10}. Für diesen entscheidenden Schritt wurden verschiedene Methoden entwickelt, die im Folgenden kurz vorgestellt und ihre Vor- und Nachteile diskutiert werden sollen. Eine Übersicht der Methoden ist in Tabelle 1-1 dargestellt.

Der Aufreinigungsschritt erfolgt bei den meisten Methoden über eine Affinitätschromatographie, bei der sich die Interaktion von in der Regel zwei Biomolekülen zunutze gemacht wird. Wenn eines dieser Moleküle an einer festen Matrix gebunden vorliegt, kann das andere aus komplexerem Material wie z.B. Zelllysaten aufgereinigt werden. Verschiedene Parameter können dabei Einfluss nehmen, wie z.B. die Bindungsaffinität der Komplexkomponenten sowie die Stabilität und Löslichkeit der Proteine während der Aufreinigung. Eine klassische Methode ist die Immunpräzipitation (IP) mit Antikörpern, die spezifisch ein Epitop des Proteins von Interesse erkennen und binden. Dadurch kann eine endogene Komponente eines Komplexes unter physiologischen Bedingungen isoliert werden. Als problematisch ist bei dieser Methode eine mögliche Kreuz-Reaktivität zwischen dem Antikörper und anderen Proteinen zusätzlich zum gewünschten Protein anzusehen. Ist die Voraussetzung eines präzipitierenden Antikörpers nicht gegeben, kann die Aufreinigung über Epitop-tags erfolgen. Dabei werden Fusionsproteine bestehend aus dem gewünschten Protein und einem Epitop-tag kloniert, welche in Zellkultursystemen exprimiert werden können. Die Aufreinigung erfolgt dabei über den angehängten Tag. Als Beispiele für solche Tags sind der Myc-tag, der HA-tag, der Flag-tag und der Strep-tag zu nennen. Neben einer hohen Reproduzierbarkeit dieser Methode

sind jedoch auch einige Nachteile aufzuführen. Zunächst einmal ist man bei dieser Methode auf die Nutzung von Zellkultursystemen limitiert. Des Weiteren besteht die Gefahr, dass es durch einen erhöhten Expressionsspiegel des Proteins zur Bildung eines Komplex-Artefaktes kommt. Nicht auszuschließen ist ebenfalls der Einfluss des Tags auf die Aktivität, Faltung sowie die Funktion des Proteins. Eine weitere etablierte Methode ist der GST-Pulldown, der jedoch vor allem zur Analyse von direkten Proteininteraktionen verwendet wird. Dabei wird das gewünschte Protein als GST-Fusionsprotein in E.coli exprimiert und in der Regel an eine Matrix gekoppelt. Auf diesem Weg können dann spezifische Bindungspartner aus komplexeren Proben wie Zelllysaten gereinigt werden. Voraussetzung für diese Methode ist die Löslichkeit des rekombinanten Proteins. Ein Vorteil dieser etablierten und robusten Methode ist, dass auch schwache Interaktionen aufgrund der hohen Menge an rekombinantem Protein detektiert werden können. Interaktionen, die von posttranslationalen Modifikationen abhängen, können über diesen Weg jedoch nicht detektiert werden. Des Weiteren muss bedacht werden, dass es zur Konkurrenzsituation hinsichtlich der Komplexpartner zwischen endogenem und rekombinantem Protein kommen kann und so nur ein geringer Anteil des rekombinanten Proteins in Komplexen vorliegt. Daher wird der GST-Pulldown hauptsächlich für die direkte Interaktionsanalyse zweier Proteine verwendet. Bei der Tandem-Affinitäts-Aufreinigung (TAP) werden zwei Tags verwendet, die durch eine Protease-Schnittstelle für die TEV (Tobacco Etch Virus)-Protease getrennt sind. Der erste Aufreinigungsschritt erfolgt dabei über den Protein A-tag. Der angereicherte Komplex wird anschließend durch die Protease abgeschnitten. Es folgt ein zweiter Aufreinigungsschritt, bei dem eine Bindung des Calmodulin Binding Peptide (CBP) an Calmodulin Beads erfolgt. Vorteil dieser Methode ist eine Reduktion der Proben-Komplexizität sowie ein geringerer Hintergrund unspezifisch bindender Proteine. Die TAP-Methode wird vor allem in größer angelegten Interaktom-Analysen verwendet⁹⁻¹¹.

Tabelle 1-1: Methoden zur Anreicherung von Proteinkomplexen (modifiziert nach Bauer und Kuster, 2003).

	Prinzip	Vorteile	Nachteile	Anwendung
Immunpräzipitation	Antikörper erkennt spezifisches Epitop	Physiologische Bedingungen Schnelle Methode	Voraussetzung: präzipitierender AK Unspezifische Bindungen möglich	Ko-Immunpräzipitationen
Epitop-Tag	Aufreinigung eines Fusionsproteins über angehängten Tag	Hohe Reproduzierbarkeit	Auf Zellsystem beschränkt Hoher Expressionsspiegel begünstigt Bildung von Artefakten Tag kann Aktivität und Funktion beeinträchtigen	Analyse von Proteinkomplexen in Zellsystemen Beispiele für Tags: Myc, HA, Flag und Strep-tag
GST-Pulldown	Rekombinantes GST-Fusionsprotein aus E.coli	Etabliert und robust Identifizierung auch schwacher Interaktionen möglich	Fusionsprotein muss löslich sein Konkurrenz mit endogenem Protein Interaktionen, die von PTM's abhängen können nicht detektiert werden	Analyse individueller Protein-Interaktionen
Tandem-Affinitäts-Aufreinigung (TAP)	Strategie mit zwei Tags (ProtA und CBP) und Spaltung durch Protease TEV	Geringere Bindung unspezifischer Proteine Mildere Bedingungen möglich	Siehe Tag-Strategie	Analyse von komplexen Proben zur Interaktom-Analyse

1.1.4 Strep-tag

Als Beispiel für eine Aufreinigung über einen Epitop-tag soll das Prinzip der Strep-tag Aufreinigung kurz erläutert werden. Der Strep-tag II, der im Folgenden

nur als Strep-tag bezeichnet wird, ist ein kleines Peptid, welches für acht Aminosäuren kodiert: WSH₆PQFEK¹². Der Strep-tag weist eine hohe Spezifität zu Strep-Tactin auf, bei dem es sich um ein modifiziertes Streptavidin handelt. Der Vorteil von Strep-Tactin ist eine deutlich höhere Bindungsaffinität für das Strep-tag Peptid¹³. Aufgrund seiner geringen Größe behindert der Strep-tag in der Regel weder die Faltung noch die Sekretion von Proteinen. Auch die Funktion der Proteine wird in der Regel nicht beeinflusst. Im Gegensatz zum His₆- oder Flag-tag ist die Aufreinigung über den Strep-tag nicht von Metallionen abhängig¹¹. Die Elution kann mit D-Biotin (hohe Affinität) oder D-Desthiobiotin (geringere Affinität) unter milden Bedingungen erfolgen. Junttila und Mitarbeiter konnten durch die Identifizierung eines aktiven PP2A Holoenzym-Komplex zeigen, dass der Strep-tag aufgrund seiner Eigenschaften gut für die Aufreinigung von Proteinkomplexen geeignet ist¹⁴. Des Weiteren konnte erfolgreich ein viraler Protein-RNA Komplex unter nativen Bedingungen isoliert werden¹⁵. Eine schematische Darstellung der Aufreinigung über den Strep-tag ist in Abbildung 1-2 gezeigt.

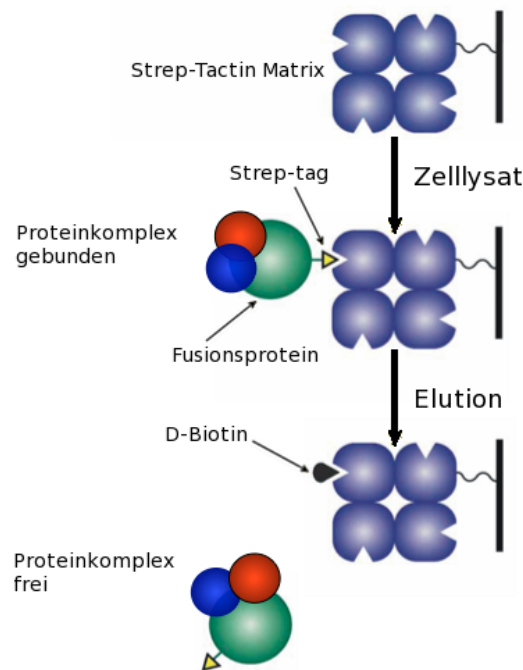


Abbildung 1-2: Prinzip der Strep-tag Aufreinigung.

Nach Äquilibration der immobilisierten Strep-Tactin-Matrix, erfolgt die Aufreinigung der Fusionsproteine aus einer komplexen Probe wie z.B. einem Gesamtzelllysat. Nachdem die Proteinkomplexe über das Strep-tag-Fusionsprotein an die Strep-Tactin Matrix gebunden vorliegen, erfolgt nach mehreren Waschschritten die Elution des Proteinkomplexes mit D-Biotin.

1.2 Hepatoma-derived growth factor (HDGF)

1.2.1 Allgemeines

HDGF ist das namensgebende Mitglied einer Familie von Proteinen, die als Wachstumsfaktoren eingeordnet werden. HDGF wurde dabei als erstes Mitglied aus dem Zellüberstand der humanen Hepatomzelllinie HuH-7, sowie einer metanephrotischen Mesenchymalzelllinie der Ratte isoliert ^{16,17}. Aufgereinigtes HDGF aus dem konditionierten Medium von Cos7-Zellen war in der Lage, die

DNA-Synthese in Fibroblasten zu steigern, so dass eine Funktion als Wachstumsfaktor für das Protein postuliert wurde¹⁸. Des Weiteren konnte eine mitogene Aktivität von HDGF auch auf glatte Muskelzellen sowie Endothelzellen gezeigt werden^{17,19}. Neben HDGF konnten noch fünf weitere Proteine identifiziert werden. Dazu zählen die HDGF-verwandten Proteine HDGF-related-proteins 1-4 (HRP-1-4) sowie der Lens epithelial-derived growth factor (LEDGF). In Abbildung 1-3 wird der modulare Aufbau der Proteine verdeutlicht.

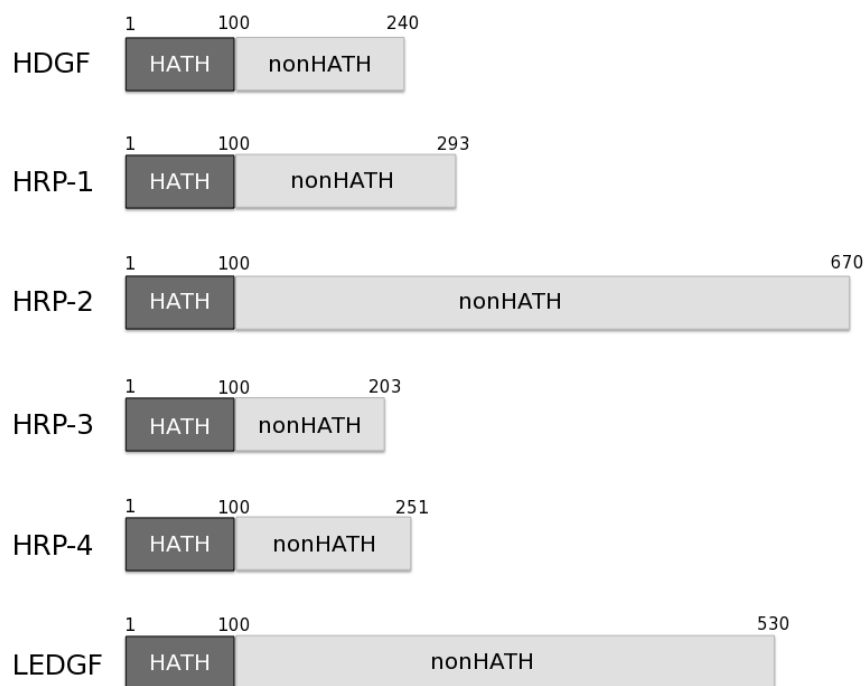


Abbildung 1-3: Aufbau und Struktur der Mitglieder der HDGF-Proteinfamilie.

Alle Mitglieder weisen eine hoch konservierte Region im N-Terminus auf. Diese Region wird als HATH (Homolog zum Aminoterminus von HMGF)-Domäne bezeichnet und umfasst die ersten 100 Aminosäuren. Der C-Terminus (nonHATH) beschreibt den spezifischen Bereich der Mitglieder und unterscheidet sich sowohl hinsichtlich Länge als auch Aminosäurezusammensetzung stark. Die Zahlenangaben in der Abbildung beschreiben die Sequenzlängen der einzelnen Mitglieder.

Allen Mitgliedern gemeinsam ist eine stark konservierte Region im N-Terminus, die aus den ersten 100 Aminosäuren besteht und als HATH (Homolog zum Aminoterminus)

Aminoterminus von HDGF)-Region bezeichnet wird. Der C-terminale Teil der Proteine, die nonHATH-Region, unterscheidet sich dagegen sowohl in Länge als auch in der Aminosäurezusammensetzung stark. Die cDNA von HDGF kodiert mit 240 Aminosäuren für ein 27 kDa großes Protein, welches aufgrund seiner Primärsequenz 23 % Identität zum High Mobility Group (HMG)-1 Protein aufweist¹⁸. Das klassische HMG-Box Motif dieser Proteine enthält HDGF jedoch nicht. Es konnte gezeigt werden, dass HDGF in der Lage ist, über eine PWWP-Domäne die im N-Terminus lokalisiert ist, eine 37 bp lange DNA-Sequenz spezifisch zu binden. Diese Sequenz konnte unter anderem in der Promoter-Region des SMYD1-Gens nachgewiesen werden²⁰. Des Weiteren konnte für HDGF eine reprimierende Funktion auf die Transkription gezeigt werden. Dabei bindet HDGF an das C-terminale Bindeprotein (CtBP) und führt darüber zu einer Repression der Transkription des SMYD1-Gens²¹.

Während die Expression von HRP-3 auf das Nervensystem²² und von HRP-4 auf den Hoden²³ beschränkt ist, werden HRP-2 und HDGF ubiquitär exprimiert²². Die zelluläre Lokalisation von HDGF ist überwiegend nukleär, was durch seine zwei nukleären Lokalisationssignale (NLS 1 und 2) bedingt wird. Die nukleäre Lokalisation von HDGF ist dabei die Voraussetzung für die mitogene Aktivität des intrazellulären Proteins¹⁹. Neben seiner nukleären Lokalisation in glatten Muskelzellen²⁴ ist HDGF in Mesenchymal- sowie Hepatomzellen im Zytoplasma lokalisiert^{17,25}. Neben dem intrazellulären HDGF ist auch extrazelluläres HDGF in der Lage mitogene Aktivität auszuüben. Voraussetzung dafür ist die Sekretion von HDGF, die aufgrund eines fehlenden Signalpeptids über einen bisher noch unbekannten Sekretionsweg erfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass die ersten 10 Aminosäuren von HDGF für die Sekretion verantwortlich sind²⁶. Beim extrazellulären HDGF sind im Gegensatz zum intrazellulären HDGF die Aminosäuren 81-100 ausreichend, um die Proliferation von Fibroblasten zu steigern²⁷. Neben der Bindung von HDGF an Heparansulfat wird jedoch ein weiterer, bislang unbekannter Rezeptor für die proliferative Wirkung benötigt²⁸.

HDGF wird während der Entwicklung von Herz, Niere, Lunge, Leber, Gastrointestinal-Trakt sowie dem vaskulären System differentiell exprimiert^{17,24,29-31}. Eine grundlegende Rolle von HDGF während der Organentwicklung konnte jedoch anhand eines HDGF-defizienten Mausmodells nicht gezeigt werden³².

Über eine Beteiligung von HDGF an der normalen Entwicklung hinaus wird HDGF ebenfalls eine Rolle an der Tumorentstehung bzw. an der Progression verschiedener Krebsformen zugeschrieben. Studien mehrerer Arbeitsgruppen konnten eine erhöhte Expression von HDGF in hepatozellulären Karzinomen zeigen, die mit einer schlechten Prognose für den Patienten einherging^{25,33-35}. In einem Nacktmausmodell konnten Okuda und Mitarbeiter einen Zusammenhang zwischen HDGF-Expression und Angiogenese zeigen. Hier führte die Injektion von HDGF überexprimierenden Zellen in Mäusen zur Tumorentstehung und verstärkter Angiogenese³⁶. Die Mechanismen, die zur verstärkten Angiogenese führten, waren dabei teilweise abhängig und teilweise unabhängig vom Vascular endothelial growth factor (VEGF)^{36,37}. Neben seinen proliferativen und angiogenetischen Eigenschaften wird in unterschiedlichen Ansätzen eine inhibierende Rolle für HDGF bei der Einleitung des programmierten Zelltods diskutiert. Ein Ansatz mit siRNAs gegen HDGF und die damit verbundene Verringerung der HDGF-Expression in HepG2-Zellen führte zur Induktion der Apoptose^{38,39}. Spezifische monoklonale Antikörper gegen HDGF führten im Mausmodell zu einem geringeren Tumorwachstum und verstärkter Apoptose in nicht-kleinzelligen Lungentumoren⁴⁰. Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint HDGF als interessantes Zielmolekül in der Krebstherapie. Die genauen Mechanismen, über die HDGF seine proliferativen, angiogenetischen sowie antiapoptotischen Eigenschaften vermittelt, sind jedoch bis heute weitestgehend ungeklärt.

1.2.2 HDGF und Proteomik

Vergleichende Proteomstudien haben das Ziel, in einem allgemeinen Ansatz Proteine zu ermitteln, die sich bei verschiedenen Bedingungen hinsichtlich ihres

Expressionsspiegels oder ihrer posttranslationalen Modifikationen unterscheiden. HDGF konnte dabei in einigen Studien identifiziert werden. So konnten Bernard und Mitarbeiter in einem vergleichenden Proteomansatz zur Entwicklung von Melanomen zeigen, dass die HDGF-Expression mit der Entwicklung der Melanomen korrelierte. Dabei wurde mit Hilfe einer zweidimensionalen Gelelektrophorese und anschließender Massenspektrometrie gezeigt, dass HDGF in späten Stadien von Melanomen sehr stark, in Melanozyten und Vorstadien hingegen nur gering exprimiert wurde⁴¹. Auch Hayashi und Mitarbeiter konnten HDGF in einer vergleichenden Proteomstudie identifizieren. Dabei wurde das Expressionsverhalten von Proteinen in regressiven und progressiven Fibrosarkomzellen untersucht. HDGF wies dabei eine verstärkte Expression in den progressiven Tumorzellen auf⁴². HDGF konnte ebenfalls in einer vergleichenden Studie zur Analyse der Expression von Proteinen in vier humanen hepatozellulären Karzinomzelllinien mit unterschiedlichem Grad der Metastasierung identifiziert werden. Ziel dieser Proteomstudie war es, Proteine zu identifizieren, die im Zusammenhang mit dem Vorgang der Metastasierung stehen. Es konnte gezeigt werden, dass HDGF zusammen mit 28 weiteren Proteinen in den Zellen verstärkt exprimiert wurde. Des Weiteren führte die Behandlung der Zellen mit siRNAs gegen HDGF und einer damit einhergehenden verringerten HDGF-Expression zur Induktion der Apoptose⁴³. Neben dem Expressionsmuster von Proteinen ist auch die Analyse posttranslationaler Modifikationen ein wichtiger Bestandteil von vergleichenden Proteomanalysen. In Untersuchungen zum nukleären Phosphoproteom von HeLa-Zellen konnten Phosphorylierungsstellen für HDGF an Serin 165, Serin 132, Serin 133 sowie Serin 218 identifiziert werden⁴⁴. Darüberhinaus konnte in einer Analyse des Phosphoproteoms von Kolonadenokarzinomzellen Serin 165 als phosphoryliertes Peptid in der Massenspektrometrie identifiziert werden⁴⁵. Ali und Mitarbeiter konnten ein phosphoryliertes Peptid von HDGF (Serin 165) in einer Studie zum TGF β -induzierten Phosphoproteom nachweisen. Die Analyse erfolgte hier an SILAC (Stable isotope labeled amino acids in cell culture) markierten Kolonkarzinomzellen⁴⁶. Des Weiteren zeigten Clermont und Mitarbeiter, dass

eine mögliche Regulation von HDGF in der frühen Phase der TNF-vermittelten Apoptose durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung im Nukleus stattfindet⁴⁷. Neben diesen allgemeinen Proteomstudien, in denen HDGF zusammen mit anderen Proteinen identifiziert werden konnte, gibt es bisher nur wenige Studien, die sich mit einer direkten Analyse von HDGF beschäftigen. Schwerpunkt dieser Studien ist die Analyse der posttranslationalen Modifikationen von HDGF und ihr Einfluss auf seine Funktion. Für die Phosphorylierung von HDGF an Serin 103 konnte gezeigt werden, dass sie für die mitogene Aktivität von HDGF in glatten Muskelzellen notwendig ist⁴⁸. Neben Phosphorylierungen konnte auch eine SUMOylierung von HDGF nachgewiesen werden. Die kovalente Bindung von SUMO-1 an Lysin 80 von HDGF führte zu einer verminderten Bindung des Proteins an Chromatin⁴⁹. Neben der Fragestellung nach möglichen posttranslationalen Modifikationen von Proteinen ist auch die Identifizierung von Proteinnetzwerken ein wichtiges Ziel im Rahmen von Proteomuntersuchungen. Die Identifizierung von Interaktionspartnern ermöglicht es, Einblicke in die beteiligten Signalwege des Proteins zu erhalten. Für HDGF wurde dieser Ansatz bisher nur in einer Studie adressiert. Dabei konnten Lepourcelet und Mitarbeiter einen nukleären HDGF-Komplex isolieren, der neben HDGF die Proteine TLS/FUS sowie die heterogenen Ribonukleoproteine (hnRNPs) K und I enthielt. Bei TLS/FUS handelt es sich um ein Onkoprotein, welches in Sarkomen und hematopoetischen Tumorerkrankungen stark exprimiert wird. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass TLS/FUS in der Lage ist, RNA zu binden⁵⁰. Aufgrund der identifizierten Proteine postulierten Lepourcelet und Mitarbeiter eine Beteiligung von HDGF an der RNA-Prozessierung in Tumoren. Eine funktionelle Bedeutung dieses Komplexes konnte jedoch nicht gezeigt werden³¹.

1.3 Ziel der Arbeit

In zahlreichen Studien konnten für HDGF proliferative, angiogenetische und antiapoptotische Eigenschaften nachgewiesen werden. Des Weiteren korreliert die HDGF-Expression in einigen Tumoren stark mit der Malignität des Tumors und der Lebensdauer der Patienten. HDGF wird daher eine vielversprechende Rolle als potentieller prognostischer Marker für einige Tumorarten zugesprochen. Es konnte bis heute jedoch nicht ausreichend geklärt werden, über welche Mechanismen HDGF diese Eigenschaften vermittelt. Ein Ziel in der HDGF-Forschung ist es daher, die beteiligten Signaltransduktionswege zu ermitteln. Die Analyse von Proteinnetzwerken ermöglicht es, auf bislang unbekannte Funktionen von Proteinen rückzuschließen. Für HDGF wurde dieser Ansatz bislang lediglich in einer Studie adressiert. Der Zusammenhang zwischen den ermittelten Interaktionspartnern und möglichen Funktion(en) von HDGF konnte bis heute jedoch nicht gezeigt werden.

Aufgrund des Fehlens funktioneller Daten für HDGF sollte das Ziel dieser Arbeit sein, weitere potentielle Interaktionspartner von HDGF in einem gezielten Proteomansatz zu identifizieren und mögliche Funktionen der Interaktionen zu analysieren. Da HDGF seine proliferativen Eigenschaften auf zwei verschiedenen Wegen (extrazellulär und intrazellulär) ausüben kann, sind für HDGF zwei Ansätze denkbar gewesen. Zum Einen konnte bis heute kein potentieller Rezeptor für HDGF auf der Zelloberfläche identifiziert werden und zum Anderen fehlen funktionelle Daten zu Interaktionen von HDGF in der Zelle. In dieser Arbeit sollte das Augenmerk auf den intrazellulären HDGF-Interaktionen liegen. Dafür sollte zunächst gezeigt werden, ob HDGF in hochmolekularen Komplexen in der Zelle vorkommt. Anschließend sollten mögliche Komplexe über affinitätschromatographische Methoden isoliert und ihre Komponenten in der Massenspektrometrie analysiert werden. Bei erfolgreicher Identifizierung von interagierenden Proteinen sollte ein weiteres Ziel dieser Arbeit sein, die Funktion der Interaktionen von HDGF näher zu untersuchen. Hauptziel dieser Untersuchungen sollte sein, einen Einblick in das

Interaktom von HDGF in der Zelle zu erhalten und auf diesem Weg einen Teil zur mechanistischen Aufklärung seiner Eigenschaften beitragen zu können.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung		Hersteller
Blotting Papier		Schleicher&Schüll
Einmalpipetten		
Einmalspritzen	5,10 und 20 ml	B.Braun
Kryogefäße		Nalgene
Nitrozellulose Transfer Membran		Schleicher&Schüll
Objektträger		Engelbrecht
Paclitaxel		Cytoskeleton
Pasteurpipetten		Assistent
Petrischalen	10 cm	Sarstedt
Pipettenspitzen	weiß, gelb und blau	Greiner
Plastikröhrchen	15 und 50 ml	Sarstedt
Probengefaß Glas Masse		CS-Chromatographie
Reagiergefäße	0,2 - 2 ml	Sarstedt
Röntgenfilm SuperRX		Fuji Medical X-Ray Film
Sterilfilter	0,2 und 0,45 µm Porengröße	Millipore
Strep-Tactin® MacroPrep Beads	4 ml	IBA Tag Göttingen
Strep-Tactin® Z-Säulen		IBA Tag Göttingen
Strep-Tactin® S-Säulen	0,2 ml	IBA Tag Göttingen
Strep-Tactin® Sepharose Beads	4 ml	IBA Tag Göttingen
Vollpipetten	5,10 und 25 ml	Heinrich EM
Zellkulturplatten	10 cm, 6 well, 24 well	Greiner Bio-One

2.2 Chemikalien

Sofern nicht anders erwähnt, wurden Chemikalien von Roth, Fluka oder Merck bezogen. Für die Extraktion von DNA wurden die entsprechenden Kits von Qiagen und Fermentas verwendet. Restriktionsenzyme wurden ebenfalls von Fermentas erworben.

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Invitrogen
DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol)	Sigma Aldrich
Dc Protein Assay Reagent A, B und S	BioRad
DSS	Sigma Aldrich
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen
Fluorescein 2 µM	Sigma Aldrich
Glutamax™ (Zellkultur)	Gibco BRL
HABA	IBA Tag Göttingen
Milchpulver	Reformhaus
Mowiol 4-88	Calbiochem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BioRad
PAGE Blue™ Staining Solution	Fermentas
Paraformaldehyd	Merck
Protein A Sepharose™CL-4B	GE Healthcare
SYBR® Green Jump Start™ Taq Ready Mix™	Sigma Aldrich
Trizol	Invitrogen
Trypsin Massenspektrometrie	Sigma Aldrich
Trypsin-Lösung Zellkultur	Gibco BRL
Tween 20	Sigma Aldrich
Verstärkte Chemilumineszenz-Lösung (ECL)	Pierce

2.3 Allgemeine Lösungen und Puffer

Sofern nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Lösungen und Puffer nach Vorschrift aus dem Laborhandbuch von Sambrook (Sambrook, 1989) hergestellt.

Name	Bestandteile	Herstellung
10x Anodenpuffer BN-PAGE	500 mM Tris-HCl	Substanzen in ddH ₂ O lösen und auf pH 7,0 einstellen.
10x Kathodenpuffer BN-PAGE	500 mM Tricin 150 mM Tris +/- 0,2 % Coomassie G	Substanzen in ddH ₂ O lösen und auf pH 7,0 einstellen.
10x PBS	1,71 M NaCl (100 g/l) 33,5 mM KCl (2,5 g/l) 40 mM Na ₂ HPO ₄ (7,12 g/l) 18,4 mM KH ₂ PO ₄	Substanzen in ddH ₂ O lösen und den pH auf 7,4 einstellen.
10x Probenpuffer BN-PAGE	5 % Coomassie G 500 mM ε-Aminocapron- säure 100 mM Bis-Tris-HCl	Substanzen in ddH ₂ O lösen und auf pH 7,0 einstellen.
10x SDS-Laufpuffer	30,3 g Tris-Base 144,0 g Glycerin 10 g SDS	Ad 1 l mit ddH ₂ O auffüllen.
10x Tris gepufferte Saline (TBS)	0,5 M Tris-HCl (78,8 g/l) 1,5 M NaCl (87,66 g/l)	In 800 ml ddH ₂ O lösen und pH Wert auf 7,4 einstellen. Anschließend mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen.
2x HBS-Puffer	50 mM Hepes 280 nM NaCl 1,5 mM Na ₃ PO ₄	Substanzen in ddH ₂ O lösen und auf pH 7,13 einstellen.

Material

3x Trenngelpuffer BN-PAGE	200 mM ϵ -Aminocapron- säure 150 mM Tris-HCl	Substanz in ddH ₂ O lösen und auf pH 7,0 einstellen.
4x SDS-Proben- puffer nach Lämmli	0,25 M Tris-HCl 8 % SDS 40 % Glycerol 10 % β -Mercaptoethanol 0,004 % Bromphenolblau	Substanzen in ddH ₂ O lösen und auf pH 6,8 einstellen.
50x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer	2,5 M Tris 100 mM EDTA 1 M Natriumacetat	Substanzen in ddH ₂ O lösen und mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen.
ABC-Lösung	50 mM NH ₄ HCO ₃	Substanzen in ddH ₂ O lösen und auf pH 7,0
Agarplatten	LB-Medium 1,5 % Agar (w/v)	Autoklavierte Lösung wird auf ca. 50°C abgekühlt und in Petrischalen gegossen.
Ampizillin-Stocklösung	100 mg/ml	Substanz in ddH ₂ O gelöst.
Blotpuffer	48 mM Tris-Base 39 mM Glycin 0,037 % SDS 20 % MeOH (v/v)	Substanzen in 800 ml ddH ₂ O lösen und mit MeOH auf 1000 ml auffüllen.
DAPI	5 mg/ml	
Elutionspuffer Strep-tag	2,5 mM Biotin / Desthiobiotin 100 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA	Substanzen in ddH ₂ O lösen und auf pH 8,0 einstellen.
Entfärbe-Lösung	200 mM NH ₄ HCO ₃ 40 % Acetonitril	Substanzen in ddH ₂ O lösen und auf pH 8,2 einstellen.
Ethidiumbromid-Lösung	5 mg/ml	Substanz in ddH ₂ O gelöst.

Material

HB-Puffer	10 mM Hepes 2 mM MgCl ₂	Substanzen in ddH ₂ O lösen und auf pH 7,4 einstellen.
IAA-Lösung	50 mM IAA in UA	
Kanamycin-Stocklösung	50 mg/ml	Substanz in ddH ₂ O gelöst.
LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Bacto-Hefe Extrakt 10 g/l NaCl	Substanzen in 1 l ddH ₂ O lösen und auf pH 7,5 einstellen. Anschließend autoklavieren.
Lysispuffer 1 für Zellen	50 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % Triton X100 1 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Pepstatin Phosphataseinhibitoren	Substanzen in ddH ₂ O lösen und auf pH 7,4 einstellen. Protease- und Phosphataseinhibitoren frisch zusetzen.
Lysispuffer 2 für Zellen	50 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM EDTA 7,5 % Glyzerol 1 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Pepstatin Phosphataseinhibitoren	Substanzen in ddH ₂ O lösen und auf pH 7,4 einstellen.
Mowiol	Lösung 1: 20 mg Mowiol 80 ml 1x PBS pH 7,3 40 ml Glyzerin (87 %) 2 mM NaN ₃ Lösung 2: 2,5 mg n-Propylgallate 50 ml 1x PBS pH 7,3 50 ml Glyzerin	Gebrauchslösung: 7,5 ml Lsg.1 + 2,5 ml Lsg.2 Lagerung bei 4°C

Material

Natriumdodecylsulfat-Lösung (10 %)	10 g SDS	Substanz in 100 ml ddH ₂ O bei 65°C lösen und sterilfiltrieren.
Paraformaldehyd (PFA)/ Sukrose	8 % PFA 10 % Sukrose	PFA in ddH ₂ O lösen und unter Zugabe von NaOH lösen. Sucrose und 10x PBS zugeben und auf das gewünschte Volumen mit ddH ₂ O auffüllen.
Ponceau S-Lösung	0,2 % Ponceau 3 % TCA	
Regenerationspuffer Strep-tag	1 mM HABA 100 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA	Substanzen in ddH ₂ O lösen und auf pH 8,0 einstellen.
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris	Substanz in ddH ₂ O lösen und den pH auf 6,8 einstellen.
Trenngelpuffer SDS-PAGE	1,5 M Tris-HCl	Substanz in ddH ₂ O lösen und auf pH 8,8 einstellen.
Tris gepufferte Saline / Tween (TBS/T)	1xTBS 0,5 % Tween 20	10x TBS 1:10 mit ddH ₂ O verdünnen. Zugabe von 0,05 % Tween20.
UA-Lösung	8 M Urea 100 mM Tris-HCl	Substanzen in ddH ₂ O lösen und auf pH 8,5 einstellen.
Waschpuffer Strep-tag	100 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA	Substanzen in ddH ₂ O lösen und auf pH 8,0 einstellen.

2.4 Chemisch kompetente Zellen

Stamm	Genotyp
XL-1 Blue [®]	supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA6 thi relA1 lacF ⁺ [proAB ⁺ , lacI ^q lacZΔM15 Tn10(tet ^r)]
Bullock et al., Bio Techniques, 5, 376, 1987	

2.5 Zellkulturmedien

DMEM: 10 % FCS
 2 mM Glutamax™
 100 IU Penicillin (Gibco BRL)
 100 µg Streptomycin (Gibco BRL)

2.6 Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

Bezeichnung	Typ
HEK 293-Zellen	Humane embryonale Nierenzellen
HeLa-Zellen	Humane Zervix-Karzinom-Zelllinie

2.7 Primer

Interne Nummer	Name	Sequenz 5' - 3'	Beschreibung
1298	huGAPDH sense	gatgacatcaagaagggtg gtga	Primer für die quantitative PCR
1299	huGAPDH antisense	ctgtagccaaattcgtgtgc at	Primer für die quantitative PCR
2841	HDGF sense	gacctgtttgcgaagat	Primer für die quantitative PCR
2842	HDGF antisense	gcttgccaaacttctccttg	Primer für die quantitative PCR
2988	Bcl-2 mRNA sense	gaggattgtggccttcttg	Primer für die quantitative PCR

Material

2989	Bcl-2 mRNA antisense	agcctgcagctttgttccat	Primer für die quantitative PCR
SF-54	Bcl-2 cds sense	gcaagcttctgggaagga tggcgca	Primer für die Klonierung der Bcl-2-Deletions- konstrukte Schnittstelle HindIII
SF-55	Bcl-2 cds antisense	gcgaattctgttgacttcac ttgtggccc	Primer für die Klonierung der Bcl-2-Deletions- konstrukte Schnittstelle EcoRI
SF-57	Bcl-2 ARE1 antisense	gcgaattcgatggtgatcc ggccaacaac	Primer für die Klonierung der Bcl-2-Deletions- konstrukte Schnittstelle EcoRI
SF-91	Bcl-2 3'UTR antisense	gcgcggccgcccaggat gtacagataacccccat	Primer für die Klonierung der Bcl-2-Deletions- konstrukte Schnittstelle NotI
SF-92	Bcl-2 5'UTR sense	gcaagcttgaagctctgg agagtgctgaagat	Primer für die Klonierung der Bcl-2-Deletions- konstrukte Schnittstelle HindIII

2.8 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind im Folgenden aufgelistet und beschrieben:

Material

Interne Nummer	Name	Beschreibung
P9	pCDNA3-Vektor	Klonierungsvektor für eukaryotische Expression, CMV Promoter, T7 und Sp6 Promotoren (Invitrogen)
SF-32	mHDGFStrep-tag_pCDNA3	Expression eines HDGF Fusionsproteins mit C-terminalem Strep-tag
SF-48	Strep-tag_pCDNA3	Kontrollkonstrukt
SF-274	mHDGF_pCDNA3	Konstrukt zur Überexpression von murinem HDGF Protein
SF-443	mHDGFNLS2_pCDNA3	Überexpression von murinem HDGF Isoform 1 mit Mutation in der NLS 2
SF-606	Bcl2Volllängenklon_pCMVSPORT6	Expression von humaner Bcl-2 cds mit 5' und 3'UTR
SF-626	Bcl-2cds_pCDNA3	Expression der kodierenden Sequenz (cds) von humanem Bcl-2
SF-639	5'UTR-Bcl-2cds_pCDNA3	Expression der 5'UTR mit der cds von humanem Bcl-2
SF-640	Bcl-2cds-3'UTR_pCDNA3	Expression der cds mit 3'UTR von humanem Bcl-2

Material

SF-627	Bcl-2cds-ARE1_pCDNA3	Expression der cds mit dem ARE1 Element von humanem Bcl-2
SF-643	SEAPcds_5' und 3'UTR Bcl-2_pCDNA3	Expression der cds von SEAP mit 3' und 5'UTR von Bcl-2

2.9 Antikörper

Folgende Antikörper wurden zur Detektion von Proteinen in der Immunzytochemie und für Western Blot Analysen verwendet:

Name	Hersteller	Konzentration
Kaninchen-anti-HDGF (Maus) affinitätsgereinigt aus polyklonalem Antiserum, immunisiert mit rekombinantem murinen HDGF-GST Protein	beschrieben in Abouzied et al., 2004 Pineda	Western Blot WB: 1:2.000 Immunzytochemie IZ: 1:100
Kaninchen-anti-HDGF (Mensch) affinitätsgereinigt aus polyklonalem Antiserum, immunisiert mit rekombinantem humanem HDGF-GST Protein	Pineda	WB: 1:2.000 IZ: 1:100
StrepTactin-Peroxidase	IBA Göttingen	WB: 1:10.000
Kaninchen-anti-Bcl-2	Epitomics	WB: 1:2.000
Maus-anti-Nukleolin	Santa Cruz	WB: 1:5.000 IZ: 1:800

Material

Polyklonaler-Ziege-anti Ku86 (Dankend erhalten von S.Medunjanin, Uni Magdeburg)	Santa Cruz	WB: 1:1.000
Ziege-anti-Kaninchen Peroxidase gekoppelt	Dianova	WB: 1:10.000
Ziege-anti-Maus Peroxidase gekoppelt	Dianova	WB: 1:10.000
Ziege-anti-Kaninchen Cy3 gekoppelt	Dianova	IZ: 1:400
Ziege-anti-Maus Alexa488 gekoppelt	Molecular Probes	IZ: 1:400

2.10 Größenstandards

Folgende Größenstandards wurden für DNA-Analysen verwendet:

Name	Größen [bp]	Hersteller
λEcoRI/HindIII	564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 4286, 4973, 5148, 21226	Fermentas
λHindIII	564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416, 23130	Fermentas
100bpLadderplus	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 3000	Fermentas

Folgende Größenstandards wurden für Protein-Analysen verwendet:

Name	Größen [kDa]	Hersteller
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130, 170	Fermentas

2.11 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
AKTA Purifier		Amersham
Analysenwaage	CP 124S-OCE	Satorius
Digitales pH-Meter	761 Calimatic	Knick
Eismaschine		Ziegra
Elektrophoresekammer groß	Proteax Xi	BioRad
Elektrophoresekammer klein	Mini Protean 3	BioRad
ESI-Ionenfalle	HCT ultra	Bruker Daltonics
Filmentwickler	Curix 60	Agfa
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert	Zeiss
Gefrierschrank -20 °C		Liebherr
Gelkammer		Eigenanfertigung
Heizblock	Dry Block Heater	STAR LAB
iCycler		BioRad
Kühlschrank		AEG
Kühlschrank Zellkultur		AEG
Kühlzentrifuge groß	Rotor F34-6-38 Rotor A-4-62	Eppendorf
Kühlzentrifuge klein	Z233 MK	Hermle
Lichtmikroskop	TELAVAL 31	Zeiss
LTQ-Orbitrap	Velos	Thermo Fischer
Magnetrührer		Janke und Kunkel IKA
Mikroplattenleser	GENios	TECAN
Mikrowelle		Sharp
nano-LC	UltiMate 3000	Dionex
PCR-Cycler	T3 Thermocycler	Biometra
Semi Dry Western Blotter	Transblot SD Cell	BioRad
Speed Vac	RVC 2-18	Christ

Material

Spektralphotometer	DU 640	Beckmann
Sterilbank Zellkultur		BDK
Stromversorgung	PowerPac 200	BioRad
Stromversorgung	Power Supply S305	Life Technologies
Tischzentrifuge	54 15 D	Eppendorf
Über-Kopf-Schüttler	Rotamix RM1	Elmi
Ultraschallbad	Bransonic	Branson
Vortexer		Heidolph
Waage	PC 4400	Mettler
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q Plus	Millipore
Wasserbad Zellkultur	1083	GFL
Wassermantel Inkubator		Forma Scientific

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Techniken

3.1.1 Allgemeines

Soweit nicht anders erwähnt, wurden die Standardmethoden nach Sambrook et al. (1989) oder nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von kleinen DNA-Mengen wurde mit dem Kit von Fermentas, die Isolierung größerer Mengen mit dem Qiagen Midiprep Kit® durchgeführt. Die Durchführung erfolgte dabei nach den Angaben des Herstellers.

3.1.3 Präparation von RNA aus Zellen

Zur Isolierung von RNA aus Zellen wurde Trizol™ verwendet. Dabei handelt es sich um ein homogenes Gemisch bestehend aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat⁵¹, welches die Degradation der RNA während der Zelllyse verhindert.

Die Zellen wurden geerntet und pelletiert. Die Zellpellets wurden anschließend in 1 ml Trizol™ pro Pellet einer 10 cm Kulturschale resuspendiert und mit blauen Pipettenspitzen homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um eine Abtrennung der RNA von anderen Zellbestandteilen zu erzielen, wurden 0,2 ml Chloroform zugegeben. Nach guter Durchmischung und weiterer Inkubation für 2 min, wurden die Proben bei 12.000xg für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und die RNA durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol pro verwendetem ml Trizol™ in einem neuen Reagiergefäß gefällt. Nach Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur erfolgte ein weiterer

Zentrifugationsschritt bei 12.000xg für 10 min bei 4 °C. Die obere Phase wurde verworfen und das RNA-Pellet anschließend mit 1 ml 75 % (v/v) Ethanol unter vorsichtigem Vortexen gewaschen. Anschließend erfolgte ein finaler Zentrifugationsschritt bei 7.500xg für 5 min bei 4 °C. Das RNA-Pellet wurde für 5 min getrocknet und in einem adäquaten Volumen (10-100 µl) DEPC-H₂O resuspendiert und 5 min bei 55 °C vollständig gelöst. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte mittels Photometer bei 260 bzw. 280 nm sowie per RNA-Gelelektrophorese. Die Lagerung der RNA erfolgte für kurze Zeit bei -20 °C, für eine längerfristige Aufbewahrung bei -80 °C.

3.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische Messung von Nukleinsäuren erfolgte in Lösung bei 260 und 280 nm, wobei die Extinktion bei 260 nm ein Maß für die DNA- bzw. RNA-Menge, der Quotient aus 260 und 280 nm ein Maß für die Reinheit der Probe darstellt. Der Wert sollte bei einer kontaminationsfreien Probe zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Die Grundlage zur Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA stellt das Lambert-Beersche Gesetz dar:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

A = Absorbtion

ε = Absorbtionskoeffizient

c = Konzentration der Probe

l = Schichtdicke der Küvette [cm]

Dabei entspricht eine Absorbtionseinheit bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA. Die Vermessung von RNA und DNA-Proben erfolgte mit dem NanoDrop 2000 von peQLab.

3.1.5 Saure Ethanolfällung

Nukleinsäuren können durch saure Ethanolfällung aus einer Lösung präzipitiert werden. Zur Fällung wurden 1/10 des Probenvolumens einer 3 M Natriumacetat-Lösung pH 4,6 sowie das 2,5 fache Probenvolumen 97 %iger (v/v) Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde zunächst gevortext und anschließend für 15 min auf Eis inkubiert. Die gefällte DNA wurde bei 18.600xg für 15 min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit frisch angesetztem 70 %igem Ethanol (v/v) gewaschen. Darauf folgte ein letzter Zentrifugationsschritt für 5 min bei 18.600xg. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Pellet für 5 min getrocknet und anschließend in einem adäquaten Volumen ddH₂O (10-50 µl) resuspendiert.

3.1.6 Spaltung von Plasmid-DNA

Die Spaltung von Plasmiden erfolgt mittels Restriktionsendonukleasen, welche spezifische Basensequenzen, in der Regel Palindrome von 4-8 Basenpaaren, erkennen und an diesen die Phosphodiesterbindungen der beiden DNA-Stränge spalten. Die Aktivität der Restriktionsendonukleasen wird in Units (U) angegeben, wobei eine Unit der Menge an Restriktionsenzym entspricht, die benötigt wird um 1 µg DNA des Bakteriophagen lamda in einer Stunde zu spalten. Für die Spaltung wurden 1 µg DNA und 10 Units des Restriktionsenzym bei vorgegebener Temperatur verwendet. Die Spaltung erfolgte in der Regel innerhalb einer Stunde. Um die Vollständigkeit der Spaltung sowie die Aufreinigung der gewünschten DNA-Fragmente zu überprüfen, erfolgte eine anschließende Analyse über ein Agarosegel.

3.1.7 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

DNA- bzw. RNA-Moleküle lassen sich aufgrund der negativen Ladungen ihrer Phosphatgruppen im Gleichspannungsfeld auftrennen. Bei der analytischen oder präparativen Agarose-Gelelektrophorese wandert die elektrisch geladene

DNA bzw. RNA durch ein komplexes Polymer aus Agarose und kann so der Größe nach aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA wird dabei durch das Molekulargewicht, die Konformation, die Basenzusammensetzung sowie durch die angelegte Spannung beeinflusst. Die Konzentration der Agarose wird durch die Größe der aufzutrennenden Fragmente bestimmt (0,8 – 2 %). Mit Hilfe von Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert, kann unter UV-Licht bis zu 1 ng DNA nachgewiesen werden.

Die gewünschte Menge Agarose wird in dem entsprechenden Volumen 1x TAE-Puffer unter Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf 60 °C wird Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,7 µg/ml) zugesetzt. Die flüssige Agarose-Ethidiumbromid-Lösung wird in eine entsprechende Kammer gegossen und bei Raumtemperatur abgekühlt. Das erstarrte Agarosegel wird in eine Elektrophoresekammer überführt und die mit Ladepuffer versetzten DNA-Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer angelegten Spannung von 3-4 V/cm.

3.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel extraction Kit® der Firma Qiagen verwendet. Das DNA-Fragment wird dabei mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Reagiergefäß überführt. Die Aufreinigung erfolgte anschließend wie vom Hersteller angegeben.

3.1.9 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription erfolgt das Umschreiben von mRNA in cDNA. Für diesen Reaktionsschritt wurde das QuantiTect® Reverse Transcriptase Kit der Firma Qiagen verwendet. Zunächst erfolgte die Entfernung von möglicher Kontamination der RNA durch genomische bzw. Plasmid-DNA.

Reaktionsansatz:

10 pg - 1 µg	RNA
2 µl	gDNA Wipeout Puffer (7x)
ad 14 µl	DEPC-H ₂ O

Der Ansatz wurde für 2 min bei 42 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Zu diesen Proben wurden dann 6 µl einer Stammlösung zugegeben, die aus den folgenden Komponenten besteht:

4 µl	Quantiscript RT Puffer (5x)
1 µl	Quantiscript Reverse Transcriptase
1 µl	RT Primer Mix

Diese Ansätze wurden für 15 min bei 42 °C inkubiert und anschließend auf 95 °C für 3 min erhitzt, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Die so erzeugte cDNA wurde bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

3.1.10 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient der exponentiellen Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten. Durch Verwendung spezifischer Oligonukleotide (Primer) können mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase die gewünschten DNA-Fragmente amplifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl die Pfu-Polymerase von Fermentas als auch das RedTaq Ready Mix Kit® von Sigma verwendet.

Die Temperatur für die Anlagerung der Primer ist abhängig von ihrer Schmelztemperatur und damit von Länge und Basenzusammensetzung und sollte zwischen 5-10 °C unterhalb der Schmelztemperatur liegen. Nach

Methoden

Denaturierung (in der Regel bei 95 °C) der DNA und Anlagerung der Primer erfolgt die Verlängerungs-Phase, die in der Regel 25-35 mal durchgeführt wird und deren Dauer von der Grösse des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes abhängig ist. Die Zeiten und die Temperaturen dieser Schritte können je nach Anwendung modifiziert werden, um optimale Bedingungen für die PCR zu erreichen.

Reaktionsansatz für die Pfu-Polymerase:

5 µl	Pfu-Polymerase Puffer + MgSO ₄ (10 x)
je 1 µl	Primer 1 + 2 (10 pmol/µl)
5 µl	dNTP-Mix 2 mM
x µl	Template
1,25 U	Pfu DNA Polymerase
ad 50 µl	PCR-H ₂ O

Reaktionsansatz für den RedTaq Ready Mix:

10 µl	RedTaq Ready Mix
1 µl	Primer 1 (10 pmol/µl)
1 µl	Primer 2 (10 pmol/µl)
x µl	Template
ad 20 µl	PCR-H ₂ O

3.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch Ligation kann die durch Restriktionsspaltung linearisierte Plasmid-DNA (Vektor) mit einem weiteren DNA-Fragment (Insert) verknüpft werden, wodurch rekombinante Plasmide entstehen. Diese Reaktion wird durch Ligasen katalysiert, welche für die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen dem 5'-Phosphatende des einen und der 3'-Hydroxyl-Gruppe des anderen DNA-Moleküls verantwortlich sind. Die Bildung der Phosphodiesterbindungen erfolgt unter Hydrolyse von ATP. Die Ligation von zwei DNA-Molekülen kann sowohl bei überhängenden als auch bei nicht-überhängenden Enden erfolgen.

Für Ligationen im Rahmen dieser Arbeit wurde die T4 DNA-Ligase von Fermentas verwendet. Für einen Ligationsansatz wurden äquimolare Mengen an Vektor- und Insert-DNA eingesetzt, wobei die Menge des Inserts auf 20 ng Vektor bezogen wurde. Es wurde je eine Weiss-Einheit T4 DNA-Ligase zum Reaktionsansatz zugegeben. Die Inkubation erfolgte entweder für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Dieser Ansatz konnte anschließend für die Transformation in kompetente Bakterien verwendet werden.

3.1.12 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterien

Unter Transformation versteht man einen Prozess, bei dem Plasmid-DNA von Bakterien aus einer Lösung aufgenommen wird. Plasmid-DNA muss im Gegensatz zu linearer DNA für die Replikation nicht in das Bakterienchromosom integrieren sondern kann als eigenständiges Plasmid verdoppelt und so von Zelle zu Zelle weitergegeben werden. Zur Selektion von erfolgreich transformierten Bakterien trägt das Plasmid ein Gen wodurch dem Bakterium eine Resistenz gegen ein bestimmtes Antibiotikum vermittelt wird. Die Durchführung erfolgte nach Sambrook (1989).

3.1.13 Zyklische Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden extern von der Firma GATC durchgeführt.

3.1.14 Quantitative RT-PCR

Die quantitative Real-time PCR wurde mit dem SYBR®Green Mix von Sigma durchgeführt. Dabei lagert sich der Fluoreszenzfarbstoff SYBR®Green an die doppelsträngige DNA an, so dass die Menge der amplifizierten DNA bestimmt werden kann.

Reaktionsansatz:

5 µl	cDNA (1:5 verdünnt)
1 µl	Primer sense (10 pmol)
1 µl	Primer antisense (10 pmol)
10 µl	SYBR Green
0.2 µl	Fluoreszein 2 µM
ad 20 µl	DEPC-H ₂ O

Die Real-time PCR wurde mit folgendem Programm im iCycler von BioRad durchgeführt:

Zyklus 1 (1x)	94 °C	2 min
Zyklus 2 (40x)	94 °C	15 s
	60 °C	1 min
Zyklus 3 (1x)	82 °C	30 s
Zyklus 4 (100x)	50 °C	10 s

Die Auswertung erfolgte nach der delta-delta Methode:

$$\text{n-fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

3.2 Zellkultur

3.2.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt in einer wassergesättigten Atmosphäre in Zellkulturschalen kultiviert. Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen unter Verwendung von ausschließlich hitzesterilisierten Materialien und Einmalplastik-Materialien.

3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst pelletiert, in einer entsprechenden Menge Einfriermedium aufgenommen und in Einfrierröhrchen überführt. Zum schonenden Durchfrieren wurden die Zellen bei -80 °C in Styropor gelagert. Nach 24-48 h wurden die Zellen dann in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Stickstoff entnommen, kurz in den Händen angetaut und anschließend im Wasserbad bei 37 °C erwärmt, bis noch ein kleiner Kern des Mediums gefroren war. Die Zellen wurden aus dem Einfrierröhrchen gespült, sedimentiert und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend auf die entsprechenden Zellkulturschalen ausgeteilt.

3.2.3 Teilen von Zellen

Das Medium wurde von den Zellen abgenommen und die Zellen anschließend einmal mit sterilem PBS gewaschen, um Reste des Mediums zu entfernen. Anschließend erfolgte die Ablösung der Zellen durch Zugabe einer adäquaten Menge an 0.25 %iger Trypsin-Lösung und 5 minütiger Inkubation der Zellen bei 37 °C. Der Ablöseprozess wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, um eine zu lange Inkubation der Zellen mit Trypsin zu vermeiden. Die Zugabe von Kulturmedium führte aufgrund des enthaltenden FCS zum Stopp der Reaktion.

Die abgelösten Zellen wurden durch Zentrifugation (500xg; 5 min; RT) sedimentiert und in der entsprechenden Menge Medium (Gesamtvolumen 10 ml) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend je nach Zelltyp 1:5, 1:10 oder 1:20 in frischem Medium verdünnt.

3.2.4 Zählen von Zellen

Um eine definierte Zellanzahl zu ermitteln, wurden 10 µl einer Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Es wurden 2 x 16 Quadrate ausgezählt, die Anzahl durch 2 geteilt und mit 10 multipliziert. Daraus ergab sich die Zellzahl pro µl.

3.2.5 Transfektion von eukaryontischen Zellen

3.2.5.1 Kalziumphosphat-Kopräzipitation

Für die Transfektion wurden am Vortag 2×10^6 HEK 293-Zellen pro 10 cm Schale ausgeteilt und über Nacht im Begasungsbrutschrank bei 37 °C inkubiert. Zur Erzeugung der Kalziumphosphat-Präzipitate wurden pro Ansatz 10 µg DNA mit 65 µl einer 2 M CaCl_2 -Lösung gemischt und mit H_2O auf 500 µl aufgefüllt. Diese Lösung wurde tropfenweise unter ständigem Mischen in ein Polystyrolröhrchen überführt, in welches bereits 500 µl einer 2x HBS-Lösung vorgelegt worden waren. In der folgenden 30minütigen Inkubationszeit bildeten sich die gewünschten DNA-Kalziumphosphat-Präzipitate aus. Die Suspension wurde anschließend unter leichtem Schwenken der Zellkulturschale ins Medium getropft. Nach 16stündiger Inkubation wurden die DNA-Kalziumphosphat-Präzipitate durch Wechseln des Mediums entfernt. Je nach Analyse wurden die Zellen für weitere 24-72 h inkubiert.

3.2.5.2 Transfektion mit Turbofect®

Die Transfektion von HeLa-Zellen wurde mit dem Turbofect Transfektionreagenz von Fermentas durchgeführt. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Standardprotokoll des Herstellers.

3.3 Biochemische Arbeiten

3.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt und in einer adäquaten Menge 1x PBS aufgenommen und bei 1.200xg für 5 min bei 4 °C pelletiert. Die Zellen wurden dann je nach Analyse in 0,25-1 ml des entsprechenden Lysispuffers aufgenommen und zunächst für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte zum vollständigen Aufschluss der Zellen eine Inkubation von 3 x 10 s im Ultraschallbad, wobei die Lysate zwischen jedem Schallen für 30 s auf Eis abgekühlt wurden, um eine zu starke Erwärmung zu verhindern. Die Entfernung des Zellmaterials erfolgte durch einen Zentrifugationsschritt bei 14.000xg für 30 min bei 4 °C. Der Überstand wurde dann in ein neues Reagiergefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

3.3.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde das BioRad DC Assay System verwendet, welches auf der Lowry-Methode basiert. Bei jeder Messung wurde eine Standardgerade erstellt, bei der ausgehend von 20 mg/ml folgende Verdünnungen an BSA vermessen wurden: 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml sowie 0,0625 mg/ml. Zunächst wurden je 5 µl der Standards sowie 5 µl der Proben in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Pro Milliliter der Lösung A wurden 20 µl der Lösung S zugegeben. Von dieser Lösung A' wurden dann 25 µl zu jeder Probe gegeben und mit 200 µl Lösung B in den Vertiefungen vermischt. Es folgte eine Inkubation von 10 min bei RT, bevor die Absorption der Proben bei einer

Wellenlänge von $\lambda = 750 \text{ nm}$ im Mikroplattenleser vermessen wurde. Alle Werte wurden als Dreifachwerte gemessen.

3.3.3 Behandlung von Zelllysaten mit RNase A

Die Lysate wurden für die Untersuchung der RNA-Abhängigkeit der Proteinkomplexe vor der Aufreinigung mit RNase A behandelt. Dafür wurden die Lysate mit $25 \mu\text{g/ml}$ RNase A über Nacht bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler inkubiert.

3.3.4 SDS-PAGE

Zur Protein-Analyse wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli verwendet⁵², bei der Proteine unabhängig von ihrer Eigenladung nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dafür werden denaturierende Gele gegossen, wobei zwischen Sammel- und Trenngel unterschieden wird. Es wurden für die Analysen sowohl 10 %ige als auch 12,5 %ige SDS-Gele verwendet. Für kleine Gele betrug das Trenngelvolumen 5 ml, das des Sammelgels 1 ml. Bei großen Gelen wurden 30 ml Trenngel und 10 ml Sammelgel verwendet.

Die SDS-Gele setzten sich wie folgt zusammen:

Gelvolumen	Sammelgel (5 %)	Trenngel (10 %)
	1 ml	5 ml
H ₂ O	0,604 ml	2,400 ml
40 % Acrylamid	0,125 ml	1,250 ml
Tris HCl pH 6,8	0,250 ml	-
Tris HCl pH 8,8	-	1,250 ml
10 % SDS	0,010 ml	0,050 ml
10 % APS	0,010 ml	0,050 ml
Temed	0,001 ml	0,010 ml

Die Proben wurden mit dem entsprechenden Volumen 4x Lämmli-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Proben wurden zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei kleinen Gelen bei einer Spannung zwischen 100-200 V. Die Elektrophorese großer Gele erfolgte über Nacht bei einer konstanten Stromstärke von 12 mA und 16 °C.

3.3.5 Blau-Native Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Bei der Blau-Nativen Gelelektrophorese können Proteinkomplexe nativ elektrophoretisch aufgetrennt werden. Durch Zusatz von negativ geladenem Coomassie G in den Kathodenpuffer erhalten die Proteinkomplexe negative Ladungen und wandern zur Anode.

Ein Gradientengel für die Blau-Native Gelelektrophorese setzte sich wie folgt zusammen:

Gelvolumen	Trenngel (4 %)	Trenngel (16,5 %)
	9 ml	9 ml
H ₂ O	5,228 ml	1,117 ml
40 % Acrylamid	0,730 ml	3,050 ml
3x Gelpuffer	3,000 ml	3,000 ml
Glycerol	-	1,800 ml
10 % APS	0,038 ml	0,030 ml
Temed	0,0038 ml	0,003 ml

Die Elektrophorese erfolgte unter Kühlung und bei einer konstanten Spannung von zunächst 100 V, bis die Proben das Trenngel erreichten. Anschließend konnte die Elektrophorese bei 300-600 V beendet werden.

3.3.6 Western Blot nach dem Semi-Dry Verfahren

Beim Western Blot erfolgt der Transfer von Proteinen von einem Gel auf eine Membran. Dies ermöglicht die Analyse spezifischer Proteine aus einem

Gemisch mittels entsprechender Antikörper. Sechs Lagen Whatman-Papier wurden mit Blotpuffer angefeuchtet und auf der Anode plaziert. Die angefeuchtete Membran und das Gel wurden anschließend möglichst blasenfrei aufgelegt. Es folgten die restlichen 6 Lagen Whatman-Papier. Anschließend wurde der Deckel (Kathode) aufgelegt und der Transfer der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA pro Quadratcentimeter Gelfläche für 90 min. Anschließend wurde der Transfer durch Anfärben der Proteine auf der Membran mit Ponceau S-Lösung überprüft. Freie Bindungsstellen wurden durch Inkubation in 5 % Magermilch/TBS für 60 min unter Schütteln geblockt. Es erfolgte nun die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper, der in einer Lösung aus TBS/Tween-20 (TBS/T) und 1/10 Blocklösung verdünnt wurde. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei Raumtemperatur unter Rotation. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS/T gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte wie für den Primärantikörper beschrieben. Es folgten drei weitere Waschschrte mit TBS/T für 10 min sowie ein abschließender Waschschrte mit TBS. Die Detektion des Signals erfolgte über das System der verstärkten Chemilumineszenz (ECL) und wurde nach den Angaben des Herstellers (Pierce) durchgeführt.

3.3.7 Coomassie Färbung von SDS-Gelen

Zur Visualisierung von Proteinen in SDS-Gelen können diese mit Coomassie angefärbt werden. Nach der Elektrophorese wurden die SDS-Gele zunächst in ddH₂O für 10 min gewaschen, bevor eine mindestens einstündige Inkubation mit der PAGE Blue-Lösung von Fermentas erfolgte. Zur vollständigen Entfärbung wurden die SDS-Gele anschließend mehrmals mit ddH₂O gewaschen.

3.3.8 Immunfluoreszenzfärbung von Proteinen in Zellen

Die Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht die Analyse eines oder mehrerer

Proteine mit Hilfe von Antikörpern an fixierten Zellen. Dadurch ist nicht nur eine Analyse der Expression, sondern auch eine Aussage über die Lokalisierung der Proteine möglich. Für die Analyse wurden zunächst 30.000 Zellen pro Einsatz einer 24-Loch-Kulturschalenvertiefung auf Deckgläsern ausgeteilt. Die Zellen wurden nach 24 h mit Turbofect® wie in Absatz 3.2.5.2 beschrieben transfiziert. Die Zellen wurden dann nach weiteren 24 bzw. 48 h mit 500 µl 4 % methanolfreiem PFA oder 500 µl eiskaltem MeOH für 10 bzw. 5 min bei RT fixiert. Danach wurden die Deckgläser dreimal mit PBS gewaschen, worauf sich bei den mit PFA fixierten Zellen eine Permeabilisierung mit 0,2 % Triton X-100 für 2 min bei RT anschloss. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine Inkubation mit 3 % BSA in PBS für 30 min blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte durch Inkubation der Deckgläser auf einem 40 µl Tropfen der in 1 % BSA verdünnten Primärantikörperlösung. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer für 1 h bei Raumtemperatur. Es folgte eine Waschreihe von dreimal TBS und anschließende Inkubation mit dem Sekundärantikörper sowie der DAPI-Gebrauchslösung (1 µg/ml). Die Inkubation erfolgte analog zum Primärantikörper und wurde durch eine Waschreihe von dreimal TBS, 30 s H₂O und abschließendem kurzem Eintauchen in absolutem Ethanol beendet. Die Deckgläser wurden für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet, in 8 µl Mowiol Eindeckelmedium auf Objektträgern fixiert und bis zur mikroskopischen Analyse lichtgeschützt aufbewahrt.

3.3.9 Affinitäts-Aufreinigung von Strep-tag Fusionsproteinen

3.3.9.1 Aufreinigung über Strep-Tactin Macro Prep S-Säulen

Für die Aufreinigung der Fusionsproteine wurden folgende Puffer verwendet:

Puffer W	100 mM Tris-HCl pH 8,0
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
Puffer E	2,5 mM Biotin/Desthiobiotin
	100 mM Tris-HCl pH 8,0
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA

Um die in Zellen überexprimierten HDGF Strep-tag Fusionsproteine für weitere Analysen anzureichern, wurden verschiedene Strategien und StrepTactin-Matrices zur Aufreinigung der Fusionsproteine genutzt. Für die Aufreinigung wurde pro Ansatz Zellmaterial einer konfluenten 10 cm Schale verwendet.

Die Säulen (0,2 ml Säulenbett) wurden zunächst mit dem 2fachen Säulenvolumen Wasch-Puffer (Puffer W) äquilibriert. Anschließend wurde das Zelllysate auf die Säule gegeben. Nachdem das Zelllysate über Schwerkraft in das Säulenbett gelangt war, wurde die Säule mit 200 µl Puffer W gewaschen. Dieser Vorgang wurde vier weitere Male wiederholt. Anschließend erfolgte die Elution des Fusionsproteins in sechs Fraktionen. Dafür wurden jeweils 100 µl Elutions-Puffer mit 2,5 mM Desthiobiotin auf die Säule gegeben und die Eluat-Fractionen in Reagiergefäßen gesammelt. Die Regeneration der Säulen erfolgte durch dreimaliges Waschen der Säule mit 1 ml Regenerations-Puffer (Puffer W mit 1 mM HABA (Hydroxy-azophenyl-benzoesäure)), wobei sich das Säulenbett von gelb nach rot färbte. Die Säulen wurden anschließend mit 2 ml Puffer W bei 4 °C gelagert.

3.3.10 Aufreinigung über Strep-Tactin MacroPrep Z-Säulen

Die Säulen wurden zunächst 2 x mit 500 µl Puffer W und Zentrifugation bei 700xg äquilibriert. Anschließend wurde das Zelllysate auf die Säule gegeben und bei 700xg für 1 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem Durchfluss noch einmal wiederholt. Die Säulen wurden dann insgesamt 4 x mit 100 µl Puffer W (siehe 3.3.9.1) und Zentrifugationsschritten bei 13.200xg gewaschen. Die Elution der Fusionsproteine erfolgte mit 50 µl einer 2,5 mM Biotin-Lösung (Puffer E) bei zunächst 700xg Zentrifugation für 1 min und abschließend 30 s bei 13.200xg.

3.3.11 Aufreinigung über Strep-Tactin Sepharose und MacroPrep Beads

Pro Ansatz wurden 30 µl Beads 50 % v/v verwendet. Die Beads wurden zusammen mit dem Lysat bei 4 °C für 2 h in einem Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 3.000xg für 3 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Beads 4 x mit 500 µl Puffer W für 5 min gewaschen. Zwischen den Waschschritten erfolgten Zentrifugationen bei 3.000xg für jeweils 3 min. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Fusionsproteine mit 80 µl 2,5 mM Biotin-Lösung (Puffer E) für 1 min unter Rotation inkubiert und anschließend für 1 min bei 13.200xg zentrifugiert. Dieser letzte Schritt wurde noch ein weiteres Mal wiederholt.

3.3.12 Größenausschlusschromatographie

Zur Analyse der Größe von Proteinkomplexen kann die auch oft als Gelfiltration bezeichnete Größenausschlusschromatographie verwendet werden. Aufgrund des Siebeffektes, der durch die Porengröße des Säulenmaterials vorgegeben wird, findet eine Auftrennung nach Größe statt. Kleine Moleküle können länger in den Poren verweilen und eluieren damit später als große Moleküle, die nicht oder nur kaum in die Poren eindringen können.

Für die Analyse der HDGF-Proteinkomplexe wurde pro Lauf 200 µl Zelllysats, was ungefähr einer Menge von 1,5 mg Gesamtprotein entsprach, auf eine Superose 6 HR 10/30-Säule aufgetragen. Folgende Parameter wurden für die Läufe eingestellt: Säulenvolumen (V_c) 24 ml; Flussrate 0,25 ml pro Minute; Fraktionen 0,5 ml. Um eine Aussage über die Größe der Proteinkomplexe treffen zu können, wurde zunächst eine Standard-Proteinmischung bestehend aus 5 mg/ml Thyroglobulin, 0,3 mg/ml Ferritin, 3 mg/ml Aldolase über die Säule aufgetrennt und die entsprechenden Elutions-Volumina (V_e) in ml bestimmt. Blue Dextran (1 mg/ml) wurde verwendet, um das Ausschlussvolumen (V_o) der Säule zu bestimmen.

3.4 Massenspektrometrische Analysen

3.4.1 Probenvorbereitung

3.4.1.1 Tryptische Direkt-Spaltung von Proteinen der Eluate

Die Eluate der HDGF Strep-tag Aufreinigungen wurden ohne vorherige Auftrennung im SDS-Gel mit Trypsin gespalten. Dafür wurden 2 µl der Eluate mit Ammoniumbicarbonat-Puffer (100 mM Ammoniumbicarbonat pH 8,5) auf ein Volumen von 20 µl gebracht und mit 50 ng Trypsin über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit Heptafluor-Buttersäure angesäuert (Endkonzentration 0,1 %) und in ein Probengefäß für die Nano-LC überführt.

3.4.1.2 Tryptische Spaltung von Proteinen aus Gelstücken

Die im SDS-Gel aufgetrennten und mit Coomassie angefärbten Proteine können wie folgt der Spaltung mit Trypsin zugänglich gemacht werden:

Zunächst wurden die gewünschten Proteinbanden mit einem sterilen

Einmalskalpell aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und in 1 x 1mm große Stücke zerteilt. Um die Gelstücke zu entfärben, wurden diese in ein Reagiergefäß überführt, mit 200 µl Entfärbe-Lösung (200 mM Ammoniumbicarbonat pH 8,2 / 40 % Acetonitril) bedeckt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und der Vorgang ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde den entfärbten Gelstücken in der Speed Vac® unter Vakuum und mäßiger Wärmezufuhr (ca. 50 °C) die Flüssigkeit entzogen. Die getrockneten Gelstücke wurden dann mit 20 µl Trypsin-Lösung (50 ng Trypsin in 100 mM Ammoniumbicarbonat pH 8,5) bedeckt. Nachdem die Gelstücke die Flüssigkeit aufgesogen hatten, wurde genau soviel der Ammoniumbicarbonat-Lösung zugegeben, bis die Gelstücke vollständig bedeckt waren. Die Spaltung erfolgte dann bei 37 °C über Nacht. Nach erfolgter Spaltung der Proteine mit Trypsin wurden die Proben bei 13.200xg für 1 min zentrifugiert und der Überstand in ein Probengefäß für die Nano-LC überführt. Um Trypsin zu inaktivieren und die Probe für die nachfolgende LC-Analyse vorzubereiten, wurden die Proben abschließend mit Heptafluor-Buttersäure angesäuert (Endkonzentration 0,1 %).

3.4.2 FASP-Methode

Folgende Puffer wurden für die FASP-Methode verwendet:

UA-Puffer	8 M Urea
	100 mM Tris-HCl pH 8,5
IAA-Lösung	50 mM Iodacetamid in UA-Puffer
ABC-Lösung	50 mM NH ₄ HCO ₃ pH 8,5

Bei der FASP-Methode (Filter-Aided Sample Preparation)⁵³ findet die gesamte Probenvorbereitung auf der Membran von Filtereinheiten statt. Diese Membran ist für intakte Proteine undurchlässig. Erst die nach enzymatischer Spaltung

entstandenen Peptide können die Membran passieren. Mit dieser Methode können auch solche Proben für die Massenspektrometrie vorbereitet werden, die hohe Mengen an Detergenzien enthalten (z.B. biologische Membranen oder ganze Proteome). Die Technik der Spaltung der Proteine in Filtereinheiten hat noch weitere Vorteile. Sie ermöglicht eine Spaltung von Proteinen ohne störende Komponenten wie Nukleinsäuren oder andere Zellbestandteile. Die Konzentration der Probe bleibt während der Aufarbeitung hoch und die Präzipitation von Proteinen wird verhindert. Gleichzeitig kann in einer einzigen Filtereinheit bis zu 200 µg Gesamtprotein bearbeitet werden.

50 µl der Eluate aus der Aufreinigung über Strep-Tactin MacroPrep Beads wurden mit einer Lösung aus 4 % SDS und 100 mM DTT in 100 mM Tris-HCl pH 7,6 in gleichem Verhältnis gemischt und für 3 min bei 95 °C inkubiert. Alle weiteren Schritte fanden bei Temperaturen über 15 °C statt, um die Präzipitation von SDS zu vermeiden. Die Probe wurde nun mit 200 µl UA-Lösung in der Filtereinheit gemischt und bei 14.000xg für 15 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurden 100 µl der IAA-Lösung zugegeben und zunächst für 1 min bei 600 rpm in einem Thermomixer und weitere 20 min ohne Bewegung inkubiert. Die Filtereinheiten wurden erneut 10 min bei 14.000xg zentrifugiert. Es erfolgte eine erneute Zugabe von 100 µl UA-Lösung und ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 14.000xg für 15 min. Dieser Schritt wurde noch zwei weitere Male wiederholt. Im Anschluss wurden 100 µl der ABC-Lösung zugegeben und weitere 10 min bei 14.000xg zentrifugiert. Nun erfolgte die enzymatische Spaltung mit Trypsin auf der Membran der Filtereinheit. Dafür wurden 40 µl der ABC-Lösung mit 50 ng Trypsin zugegeben und für 1 min bei 600 rpm gemischt. Die Filtereinheiten wurden dann in einer feuchten Kammer über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Filtereinheiten wurden in neue Reagiergefäße überführt und die Peptide durch Zentrifugation bei 14.000xg für 10 min eluiert. Dieser Vorgang wurde mit weiteren 40 µl ABC-Lösung wiederholt. Die Peptidlösung wurde anschließend in der SpeedVac unter Vakuum eingedampft und mit 0,1 % Heptafluor-Buttersäure/H₂O aufgenommen.

3.4.3 Nano-LC

Die Peptide der tryptischen Spaltungen wurden vor der massenspektrometrischen Analyse über nano-Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt. Dafür wurde das Ultimate 3000 LC-System (Dionex-LC Packings) verwendet. Die Proben wurden zunächst über die Ladepumpe (10 µl/min 0,1 % Heptafluor-Buttersäure) auf eine monolithische Vorsäule (PepSwift, 200 µm x 5 mm) geladen. Nach 5 min wurde die Stellung des Ventils so verändert, dass die Proben auf die analytische Trennsäule (PepSwift monolithische Kapillarsäule, 200 µm x 50 mm) mit einer Flussrate von 500 nl/min eluiert wurden. Als mobile Phase wurden Lösung A (0,1 % Ameisensäure in H₂O (v/v)) sowie Lösung B (0,1 % Ameisensäure in ACN (v/v)) verwendet. Die Trennung der Peptide wurde über folgenden Gradienten erzielt: 5-50 % Puffer B für 20 min, gefolgt von 50-90 % Puffer B für 1 min. Nach 5 min bei 90 % Puffer B wurde der Gradient auf 5 % Puffer B zurückgefahren. Die Darstellung des Säulenausflusses erfolgte mit Hilfe einer 3 nl UV-Flusszelle bei 214 nm.

3.4.4 MS2 Analyse ESI-Ionenfalle

Die massenspektrometrische Analyse erfolgte mit Hilfe von online ESI-MS2 in der HCTUltra Ionenfalle (Bruker Daltonics). Alle Messungen erfolgten dabei im positiven Ionen-Modus. Die Massenspektren wurden im erweiterten Standard-Modus zwischen 300 bis 2.000 m/z bei einer Rate von 8.100 m/z/s erzeugt. Die Fragmentierung der Peptide der MS-Spektren erfolgte mit Hilfe eines Kollisions-induzierten Zerfalls (CID) im Auto-MS2 Modus wobei die Vorläufer-Ionen nach folgenden Kriterien ausgesucht wurden: Anzahl der Vorläufer-Ionen = 5; minimale Ionen-Intensität = 10.000; Ausschluss von Ionen nach 2 Spektren; Aufhebung des Ausschlusses nach 1 min. Die Erhebung der MS2 Daten erfolgte im Ultrascan-Modus in einem Bereich von 50 – 3.000 m/z bei einer Scan-Geschwindigkeit von 26.000 m/z/s.

3.4.5 Daten-Analyse

Die Analyse der Rohdaten aus der Ionenfalle erfolgte mit dem DataAnalysis™ Programm Version 4.0. Alle MS2-Daten eines Vorläufer-Ions wurden durch die Auto MS2-Suchfunktion identifiziert und zusammengefasst. Diese Suche führte zur sogenannten Compound-Liste und wurde mit folgenden Parametern durchgeführt. Intensitätsgrenze = 10.000, maximale Anzahl der Compounds = 500, Retentionszeit = 0,4. Die identifizierten Compounds wurden nacheinander einer Dekonvolution unterzogen und für die weitere Analyse exportiert. Die exportierten Compounds wurden mit BioTools™ Version 3.1 gegen eine institutseigene SwissProt v51.6 Datenbank verglichen, wobei der Mascot 2.2.02 Algorithmus verwendet wurde. Bei der Datenbanksuche kamen folgende Parameter zum Einsatz: Enzym = Trypsin; nicht genutzte Schnittstellen = 1; Taxonomie = alle Spezies; variable Modifikationen = Oxidierung (M) und Carbamidomethylierung (C); Peptidtoleranz = 300 ppm; MS2-Toleranz = 1,1 Da; Signifikanzgrenze $p = 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zu HDGF-Proteinkomplexen

4.1.1 Untersuchung von HDGF-Proteinkomplexen mittels Größenausschlusschromatographie

Als Voraussetzung für die Analyse von HDGF-Proteinkomplexen und damit der Identifizierung von Interaktionspartnern sollte zunächst untersucht werden, ob HDGF in hochmolekularen Komplexen innerhalb der Zelle vorliegt. Dafür wurde eine Größenausschlusschromatographie mit einer Superose 6 HR10/30 (Superose 6)-Säule und Lysaten zwei verschiedener Zelltypen durchgeführt. Es wurde sowohl eine Tumor-Zelllinie (HeLa-Zellen) als auch eine humane Nicht-Tumor-Zelllinie (HEK 293-Zellen) untersucht. Um die Größe der Komplexe, welche HDGF enthalten, abschätzen zu können, wurde die Superose 6-Säule vor der Analyse der Zelllysate mit einer Mischung von Standard-Proteinen definierten Molekulargewichtes kalibriert. Dafür wurde ein Gemisch bestehend aus Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa) und Aldolase (158 kDa) über die Säule aufgetrennt und die Elutionsvolumina (V_e) der Proteine bestimmt. Wie in Abbildung 4-1 A zu sehen ist, betrug das Elutionsvolumen von Thyroglobulin 13 ml, Ferritin eluierte bei 15 ml und Aldolase bei 16,25 ml. Anschließend wurde zunächst die Größenverteilung von endogenem HDGF in HeLa- und HEK 293-Zellen untersucht. Dafür wurden die Zelllysate über die Superose 6-Säule aufgetrennt und das Eluat in 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Äquivalente Volumina der Fraktionen wurden im Western Blot untersucht. Wie in Abbildung 4-1 B zu sehen ist, konnte HDGF in HeLa-Zellen bereits in Fraktionen detektiert werden, die mit Molekulargewichten der Standardproteine von 669 und 440 kDa korrespondierten. In HEK 293-Zellen wurde HDGF ebenfalls in Fraktionen detektiert, die einem Molekulargewicht von 440 kDa entsprachen.

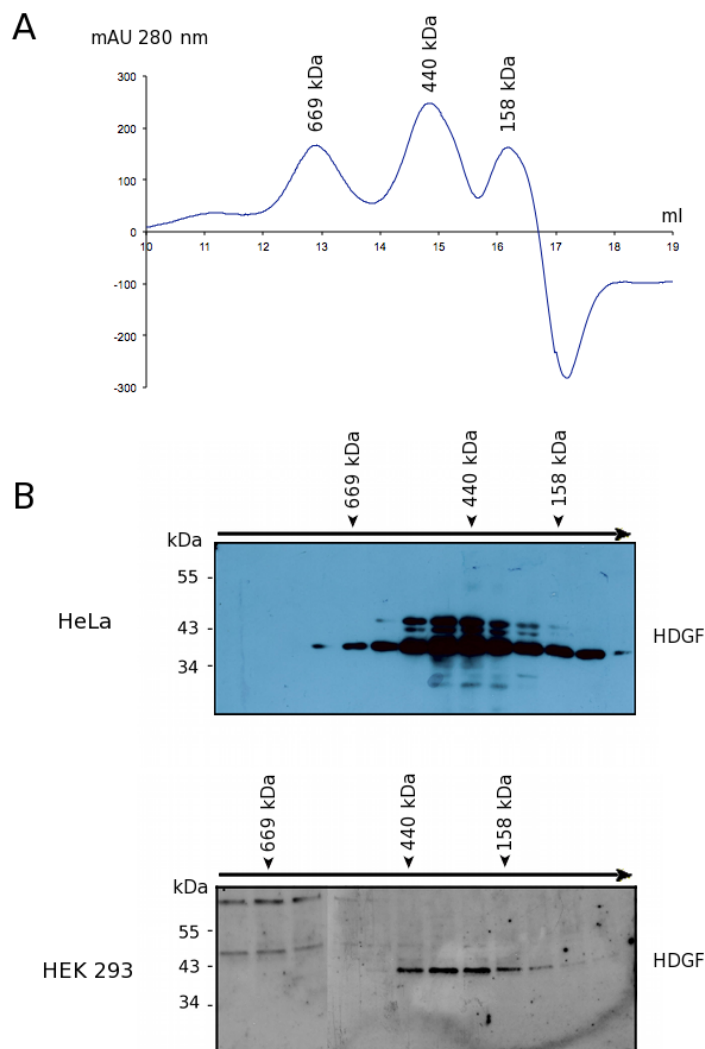


Abbildung 4-1: Größenbestimmung von endogenen HDGF-Proteinkomplexen.

(A) Um die Größe der HDGF-Proteinkomplexe abschätzen zu können, wurde zunächst ein Proteinstandard über die Superose 6 HR 10/30 Säule aufgetrennt. Dafür wurden Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa) sowie Aldolase (158 kDa) aufgetrennt und die Elutionsvolumina bei 280 nm UV bestimmt. Die Elutionsvolumina der Proteinstandards betrugen 13 ml (Thyroglobulin), 15 ml (Ferritin) sowie 16,25 ml (Aldolase). (B) Nach der Kalibrierung der Säule erfolgte die Auftrennung der Zelllysate von HeLa und HEK 293 Zellen über die Superose 6-Säule. Die Eluate wurden in 0,5 ml Fraktionen gesammelt und äquivalente Mengen im Western Blot untersucht. Sowohl für HeLa- als auch für HEK 293-Zellen konnten im Western Blot hochmolekulare Komplexe bei 440 kDa und größer detektiert werden. Die Detektion von HDGF erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-HDGF Antikörper. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mit Hilfe der verstärkten Chemilumineszenz (ECL).

Wie einleitend schon erwähnt, eignet sich der Strep-tag als Fusionstag besonders gut für die milde Aufreinigung von Proteinkomplexen. Es sollte daher zunächst untersucht werden, ob mit einem Strep-tag versehenes HDGF nach Transfektion ebenfalls in hochmolekularen Komplexen zu finden ist. Dafür wurden HeLa und HEK 293-Zellen mit einer cDNA, die für das Fusionsprotein bestehend aus der kodierenden Sequenz für HDGF sowie einem Strep-tag am C-Terminus kodierte, transfiziert und die Zelllysate anschließend über die Superose 6-Säule aufgetrennt. In Abbildung 4-2 B ist zu sehen, dass die HDGF-Fusionsproteine sowohl in HeLa als auch in HEK 293-Zellen in hochmolekularen Komplexen vorlagen. Die Bildung der Proteinkomplexe wurde durch das Hinzufügen eines Strep-tags an den C-Terminus von HDGF nicht verhindert. Diese Beobachtung war die Voraussetzung dafür, dass eine Anreicherung der HDGF-Proteinkomplexe über eine affinitätschromatographische Reinigung mit dem HDGF-Strep-tag Fusionsprotein über Strep-Tactin-gekoppelte Matrices erfolgen konnte.

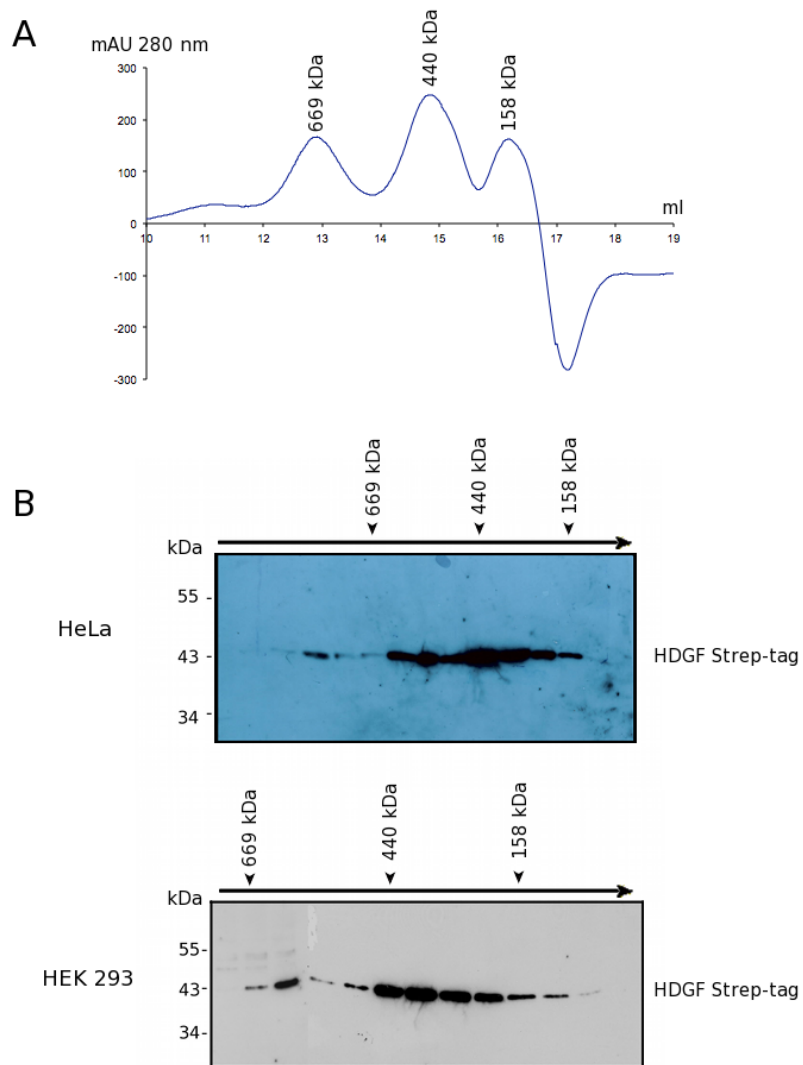


Abbildung 4-2: Größenbestimmung von HDGF Strep-tag Proteinkomplexen.

(A) Die Kalibrierung der Superose 6 HR/30 Säule erfolgte wie in Abbildung 4-1 beschrieben. (B) Mit HDGF Strep-tag transfizierte Zelllysate von HeLa- und HEK 293-Zellen wurden anschließend chromatographisch aufgetrennt und die Eluate in 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Äquivalente Volumina der Fraktionen wurden im Western Blot untersucht. Es ist zu sehen, dass das HDGF-Fusionsprotein in hochmolekularen HDGF-Komplexen zwischen 440 und 669 kDa zu finden ist. Das Fusionsprotein wurde mit einem an Peroxidase gekoppelten StrepTactin detektiert. Der Nachweis des gebundenen StrepTactin erfolgte mit Hilfe der verstärkten Chemilumineszenz (ECL).

4.1.2 Untersuchung von HDGF-Proteinkomplexen mittels Blau-Nativer-Gelelektrophorese

Eine weitere Methode zum Nachweis nativer Proteinkomplexe in Zellen ist die Blau-Native-Gelelektrophorese (BN-PAGE). Dabei werden ohne Zusatz denaturierender Agenzien Proteinkomplexe nach Größe in einem Gradientengel aufgetrennt. Durch den Zusatz des anionischen Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 erhalten die Komplexe negative Ladung und wandern zur Anode.

Wie in Abbildung 4-3 zu sehen ist, wurden 50 µg Gesamtprotein von HeLa- und HEK 293-Zelllysaten auf ein natives Gradientengel (3-16 %) aufgetragen. Zur Kontrolle wurde ein Teil der Lysate vor der Elektrophorese mit 0,5 % SDS behandelt. SDS führt durch Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen zum Verlust der Tertiär- und Sekundärstruktur von Proteinen, so dass mögliche Proteinkomplexe durch den denaturierenden Effekt von SDS in ihre einzelnen Komponenten getrennt werden. Anhand der SDS-behandelten Kontrollproben kann dann zwischen hochmolekularen Komplexen und niedermolekularen Verbindungen wie Dimeren oder Monomeren unterschieden werden. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und die HDGF-enthaltenden Proteinkomplexe mit einem HDGF-Antikörper detektiert. In den nativen Proben konnten bei beiden Zelllysaten hochmolekulare Komplexe detektiert werden, die bei den SDS-behandelten Proben in eine (HEK 293) bzw. zwei (HeLa) weitere Komponenten zerfielen. Aufgrund der detektierten Molekulargewichte bei 66 kDa und kleiner ist davon auszugehen, dass es sich dabei um Dimere und Monomere von HDGF handelte.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der Blau-Nativen-Gelelektrophorese die erzielten Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie bestätigten.

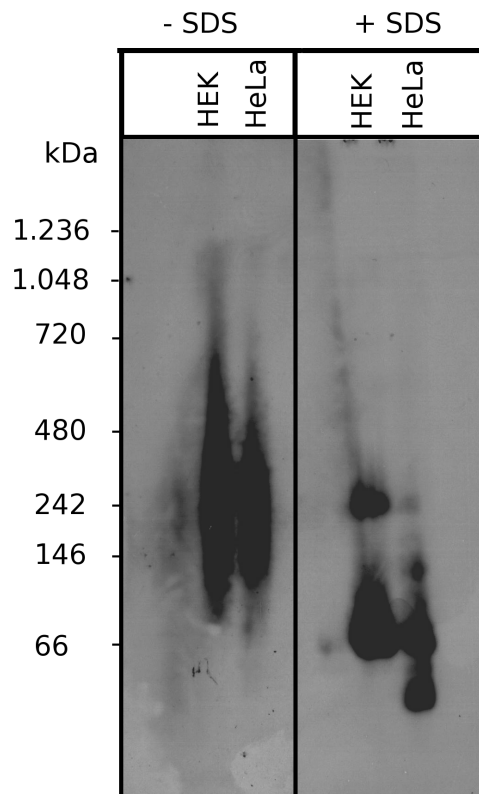


Abbildung 4-3: Blau-Native-Gelelektrophorese von HeLa und HEK 293-Zelllysaten.

Es wurden 50 µg Gesamtprotein der Zelllysate auf ein Blau-Natives-Gradientengel (3-16 %) aufgetragen. Zur Kontrolle wurde ein Teil der Lysate vor der elektrophoretischen Auftrennung mit 0,5 % SDS behandelt. Die Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert und HDGF Strep-tag mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-HDGF Antikörper detektiert. Es ist zu sehen, dass bei den nativen Proben ein Signal im höhermolekularen Bereich für HDGF detektiert werden konnte. Die SDS-behandelten Proben zeigten dagegen zwei bzw. drei Signale für HDGF. Der Größe nach handelte es sich bei dem obersten Signal bei ca. 250 kDa um den Teil eines HDGF-Komplexes, welcher durch die SDS-Behandlung nicht denaturiert worden war. Das zweite Signal bei ungefähr 66 kDa entsprach dagegen der Dimer-Größe von HDGF. Das unterste Signal entsprach dem Monomer von HDGF. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit Hilfe der verstärkten Chemilumineszenz (ECL).

4.2 Aufreinigung der HDGF-Proteinkomplexe über Strep-Tactin Matrices

HDGF-Proteinkomplexe sollten über affinitätschromatographische Methoden aufgereinigt und so für weitere Analysen angereichert werden. Dafür wurden

HDGF Strep-tag Fusionsproteine in HEK 293-Zellen transient exprimiert und die Aufreinigung der Zelllysate über verschiedene Strep-Tactin-Matrizes optimiert.

Wie in Abbildung 4-4 A zu sehen ist, konnten HDGF Fusionsproteine, die über Strep-Tactin Sepharose-Beads gereinigt wurden, nur in geringen Mengen in der Silberfärbung detektiert werden. Gleichzeitig war der Hintergrund unspezifisch bindender Proteine so groß, dass eine Identifizierung von spezifischen Bindungspartnern nicht möglich war. Neben der Sepharose-Matrix wurde auch eine Polymethacrylat (MacroPrep)-Matrix getestet. Für eine Aufreinigung im Batch-Verfahren wurden zunächst Strep-Tactin MacroPrep Beads verwendet. Wie in Abbildung 4-4 B zu sehen ist, konnte sowohl die Menge an aufgereinigtem Protein als auch die Reinheit der Eluat-Fractionen im Vergleich zur Sepharose-Matrix verbessert werden. Daher wurde nun im weiteren Verlauf der Arbeit die Aufreinigung der Fusionsproteine über die MacroPrep Matrix optimiert. Für eine schnelle Aufreinigung im kleinen Maßstab wurden Strep-Tactin MacroPrep Säulen verwendet, die für eine Aufarbeitung mit Hilfe von Zentrifugationsschritten geeignet waren. Diese werden im Weiteren als MacroPrep Z-Säulen bezeichnet. In Abbildung 4-4 C kann gezeigt werden, dass die Menge des aufgereinigten Proteins im Vergleich zu den Beads nicht weiter gesteigert werden konnte, die Reinheit der Probe aber zunahm. Wurden größere Mengen an aufgereinigtem Protein benötigt, erfolgte die Aufreinigung über Strep-Tactin MacroPrep-Säulen mit einem größeren Säulenbettvolumen. Die Aufreinigung erfolgte hier über Schwerkraft, daher werden die Säulen im weiteren Verlauf als MacroPrep S-Säulen bezeichnet. Wie in Abbildung 4-4 D zu sehen ist, konnten über diese Säulen große Mengen an reinem Fusionsprotein erhalten werden.

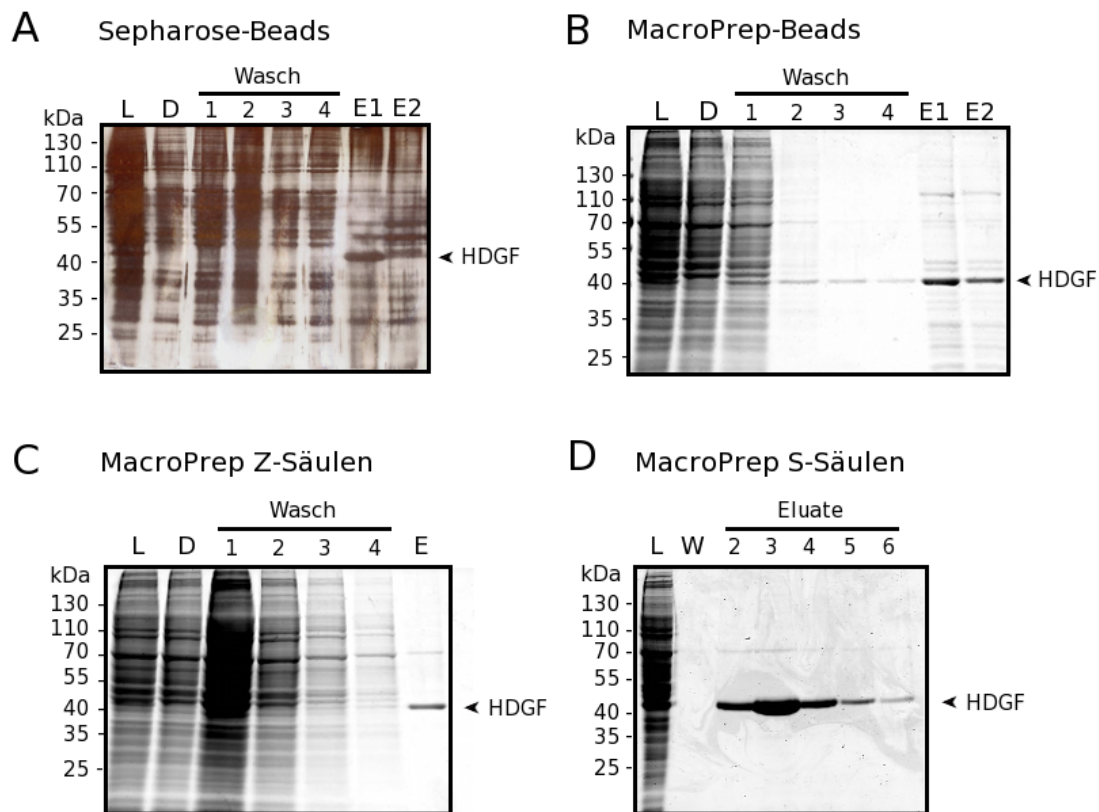


Abbildung 4-4 : Aufreinigung von HDGF Strep-tag Fusionsprotein über verschiedene Matrices.

(A) Die Aufreinigung des HDGF Strep-tag Fusionsprotein erfolgte zunächst über eine Strep-Tactin Sepharose-Matrix. Im Silbergel sind prozentual gleiche Anteile an Lysat (L), Durchfluss-Fraktion (D), Wasch-Fraktion 1-4, sowie das Gesamt-Eluat (E1 u. E2) aufgetragen. Die Eluat-Fraktion zeigt eine Anreicherung von HDGF, gleichzeitig jedoch auch einen starken Hintergrund unspezifisch angereicherter Proteine. (B) Zur Verminderung der Bindung unspezifischer Proteine wurde das HDGF Strep-tag Protein im Weiteren über eine Strep-Tactin MacroPrep-Matrix gereinigt. Im Coomassie-Gel ist zu sehen, dass in den Eluat-Fraktionen (E1 u. E2) eine stärkere Anreicherung von HDGF mit gleichzeitiger Verringerung unspezifisch bindender Proteine erzielt werden konnte. (C) Zur Optimierung der Anreicherung des Fusionsproteins wurden Zentrifugationssäulen (Z-Säulen) verwendet. Im Coomassie-Gel ist zu sehen, dass in der Eluat-Fraktion (E) ein ausreichend reines Fusionsprotein erhalten wurde. (D) Um größere Mengen an HDGF Fusionsprotein zu erhalten, wurden Schwerkraft-Säulen mit einem größeren Säulenbettvolumen (S-Säulen) für die Aufreinigung verwendet. Im Coomassie-Gel ist zu sehen, dass in den Eluat-Fraktionen 2, 3 und 4 der Hauptanteil an HDGF Fusionsprotein eluiert werden konnte. Diese Fraktionen wurden für weitere Analysen vereinigt. Pfeile in der Abbildung markieren die Proteinbande für HDGF.

Der spezifische Nachweis, dass es sich bei der aufgereinigten Proteinbande tatsächlich um HDGF handelte, erfolgte mittels Western Blot. In Abbildung 4-5 ist zu sehen, dass ein spezifisches Signal für HDGF sowohl im Ausgangs-Lysat als auch in der Eluat-Fraktion detektiert werden konnte.

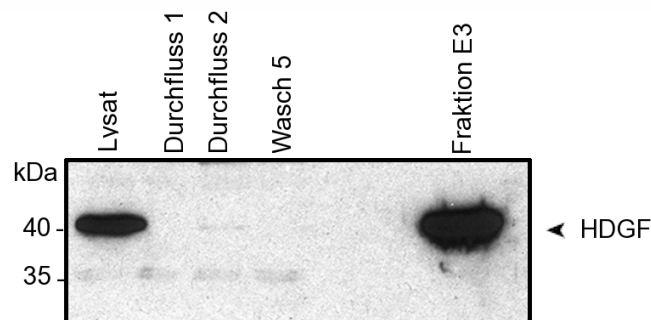


Abbildung 4-5: Verifizierung der Aufreinigung von HDGF Strep-tag mittels Western Blot.

Die Aufreinigung von HDGF Strep-tag wurde auch im Western Blot verifiziert. Dafür wurden prozentual gleiche Anteile von Lysat und Durchfluss, 1/100 der letzten Waschfraktion sowie die Hälfte der Eluat-Fraktion 3 (E3) auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Das Fusionsprotein wurde mit einem Kaninchen-anti-HDGF Antikörper detektiert. Ein Signal für HDGF konnte sowohl im Ausgangslysate als auch in der Eluat-Fraktion detektiert werden. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mit Hilfe der verstärkten Chemilumineszenz (ECL).

4.3 Identifizierung der Interaktionspartner von HDGF

4.3.1 Massenspektrometrische Identifizierung von HDGF-Interaktionspartnern

4.3.1.1 Tryptische Spaltung von Proteinen aus SDS-PAGE Gelen und Analyse der resultierenden Peptide in der ESI-Ionenfalle

Die Aufreinigung des HDGF Strep-tag Fusionsproteins wurde nun dahingehend optimiert, dass in der Coomassie-Färbung spezifische koreinigende Proteine in den HDGF Eluaten im Vergleich zu Kontroll (Mock)-Eluaten detektiert werden konnten. Die Konzentration des Ausgangslysates war dabei ein wichtiger Parameter für die Menge und Reinheit des aufgereinigten Proteins. Die Probe

sollte so konzentriert wie möglich auf die Säule aufgegeben werden, wobei sich ein Volumen von 250 µl zur Lyse für eine konfluente 10 cm Zellkulturschale als optimal erwies. Ein weiterer Parameter für die Optimierung der Aufreinigung war die Anzahl der Waschschrte. Vier Waschschrte erwiesen sich als die beste Strategie, um unspezifische Bindungen zu reduzieren und zusätzliche spezifische Proteinbanden für HDGF zu erhalten. Des Weiteren erwies sich eine direkte Verarbeitung von Zelllysaten ohne zwischenzeitlichen Einfrierschritt als beste Voraussetzung für die Aufreinigung von HDGF-Proteinkomplexen.

Die Eluat-Fraktionen der Strep-Tactin-Aufreinigung für HDGF Strep-tag sowie eine Negativ-Kontrolle (Transfektion von Leervektor) wurden über ein SDS-Gel (10 %) aufgetrennt und die Proteine im SDS-Gel anschließend mit kolloidalen Coomassie-Lösung angefärbt. Die für das HDGF-Eluat spezifischen Proteinbanden wurden mit einem Einmalskalpell ausgeschnitten und wie in 3.4.1.2 beschrieben aufgearbeitet. Die unter Vakuum eingedampften Peptid-Proben wurden in 20 µl 0,1 % Heptafluor-Buttersäure/H₂O aufgenommen, wovon 1 µl zur Analyse in die Nano-LC eingespritzt wurde. Nach der Trennung über eine monolithische Säule wurden die Peptide in der ESI-Ionenfalle analysiert.

Für das HDGF-Eluat konnten insgesamt vier spezifische Proteine identifiziert werden (Abbildung 4-6). Dabei handelt es sich um die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs) bei 476 kDa, Ku86 bei 90 kDa, die Poly-(ADP-Ribose)Polymerase-1 (PARP-1) bei 120 kDa und Nukleolin bei 110 kDa. Keines dieser Proteine konnte hingegen im Kontroll-Eluat detektiert werden.

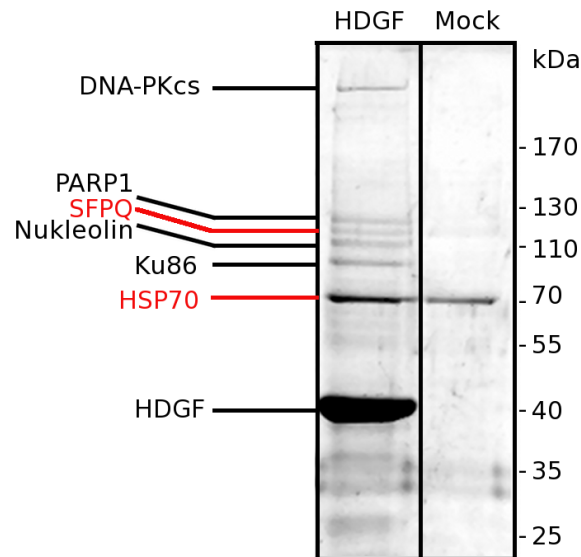


Abbildung 4-6: Ergebnisse der LC-MS Analyse tryptisch gespaltener Proteine aus Gelbanden von HDGF- und Kontroll-Eluat-Fractionen.

Eluate für HDGF und Kontrolle (Mock) aus der optimierten Aufreinigung mit Strep-Tactin MacroPrep Z-Säulen wurden elektrophoretisch in einem SDS-Gel (10 %) aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Lösung angefärbt. Die Proteinbanden, die nicht in der Mock-Kontrolle zu detektieren waren, sowie eine Proteinbande, die in beiden Eluaten zu sehen war, wurden ausgeschnitten, die Proteine tryptisch gespalten und die Peptide anschließend in der NanoLC-ESI-Ionenfalle untersucht. Als spezifische Bindungspartner von HDGF konnten bei > 170 kDa die DNA-PKcs, bei 120 kDa PARP-1, bei 90 kDa Ku86 und bei 110 kDa Nukleolin ermittelt werden. HSP70 und SFPO, in rot dargestellt, binden unspezifisch an die Säulen-Matrix und wurden in beiden Eluat-Fractionen detektiert.

Um die Qualität der massenspektrometrischen Analyse zu beurteilen, wurden verschiedene Parameter herangezogen. Tabelle 4-1 zeigt in einer Übersicht einige Parameter der identifizierten Proteine. Neben physiko-chemischen Parametern wie dem Molekulargewicht (MG) und dem isoelektrischen Punkt (pI) ist die Anzahl der identifizierten Peptide und die ermittelte Sequenzabdeckung aufgelistet.

Tabelle 4-1: Liste der identifizierten Proteine aus der LC-MS Analyse.

Dargestellt sind der Proteinname, die UniProtKB/SwissProt ID, das Molekulargewicht (MG) in kDa, die Anzahl der ermittelten Peptide, die Sequenzabdeckung in % sowie der isoelektrische Punkt (pI).

Protein	SwissProt ID	MG (kDa)	Peptide	Sequenzabdeckung (%)	pI
Nukleolin	P19338	77	13	22	4.60
PARP-1	P09874	113	15	18	8.99
Ku86	P13010	83	14	26	5.55
DNA-PKcs	P78527	468	20	6	6.75

Die Anzahl der ermittelten Peptide ermöglicht eine Aussage zur Qualität und Spezifität des identifizierten Proteins. Über die Anzahl der identifizierten Aminosäuren in Bezug zur Primärsequenz des Proteins lässt sich dann die Sequenzabdeckung berechnen. Je höher die Sequenzabdeckung bzw. die Anzahl der identifizierten Peptide, desto spezifischer ist ein Treffer zu bewerten. Für Nukleolin konnten 13 Peptide in der MS/MS-Analyse detektiert werden, was einer Sequenzabdeckung von 22 % entsprach. 15 Peptide konnten für PARP-1 identifiziert werden, was eine Sequenzabdeckung von 18 % ergab. 26 % Sequenzabdeckung konnte mit 14 Peptiden für Ku86 erzielt werden. Die höchste Anzahl mit 20 Peptiden konnte für die DNA-PKcs detektiert werden, was bei einer Primärsequenz von 4128 Aminosäuren zu einer Sequenzabdeckung von 6 % führte. Aufgrund der ermittelten Anzahl von Peptiden der identifizierten Proteine kann von einer hohen Spezifität der ermittelten Protein-Treffer ausgegangen werden. Eine Auflistung der identifizierten Peptide ist im Anhang dargestellt (Punkt 8.1.1).

4.3.1.2 Tryptische Spaltung der Proteine aus den Eluat-Fraktionen und Analyse der resultierenden Peptide in der ESI-Ionenfalle

Um Interaktionspartner zu identifizieren, die möglicherweise nur zu geringen Anteilen mit HDGF interagieren und daher in der Coomassie-Färbung nicht sichtbar waren, wurden die Proteine in den Eluat-Fraktionen der Strep-Tactin-Aufreinigungen auch ohne vorherige Auftrennung im SDS-Gel direkt einer enzymatischen Spaltung mit Trypsin unterzogen. 2 µl der Eluat-Fraktionen wurden mit Trypsin-Lösung versetzt und wie in 3.4.1.1 beschrieben aufgearbeitet. Es wurden die resultierenden Peptide der HDGF-Eluate sowie der Kontroll-Eluate in der ESI-Ionenfalle untersucht, um bei der Auswertung zwischen spezifischen und unspezifischen Protein-Treffern unterscheiden zu können. In Tabelle 4-2 sind die für die HDGF-Probe spezifischen Proteintreffer dargestellt, die in den Kontroll-Eluaten (transfizierter Leervektor) nicht detektiert werden konnten. Die Proteine Nukleolin und Nukleophosmin wurden dabei als spezifische Proteine in beiden Proben detektiert. Darüberhinaus konnten noch zwei ribosomale Proteine sowie das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein A1 identifiziert werden. Eine vollständige Liste der identifizierten Proteine aus drei unabhängigen Experimenten der HDGF- sowie der Kontroll-Eluate befindet sich im Anhang (Punkt 8.1.2).

Tabelle 4-2: Liste der identifizierten Proteine der tryptischen Spaltung von Eluaten zwei verschiedener Experimente ohne vorherige Auftrennung in SDS-PAGE.

Aufgelistet ist neben der Treffer-Nummer und dem Namen des identifizierten Proteins seine Swiss Prot ID, die Anzahl der gefundenen Peptide und das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa).

Treffer Nr.	Protein	Swiss Prot ID	Peptide	MG (kDa)
2	Nukleolin	P19338	6	77
3	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein A1	P09651	4	34
5	Nukleophosmin	P06748	2	33

Treffer Nr.	Protein	Swiss Prot ID	Peptide	MG (kDa)
2	Nukleolin	P19338	8	77
6	Nukleophosmin	P06748	4	33
7	40S ribosomales Protein S15	P62841	4	17
8	60S ribosomales Protein L18	Q07020	2	22

4.3.2 Verifizierung der mit Massenspektrometrie identifizierten Kandidaten mittels Western Blot

Die in der massenspektrometrischen Analyse identifizierten Interaktionspartner von HDGF sollten im Western Blot verifiziert werden. Dafür wurden die Ausgangs-Lysate sowie ein Zehntel der Eluat-Fraktionen von HDGF und der entsprechenden Kontrolle in einem SDS-Gel (10 %) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Analyse erfolgte mit einem käuflich erworbenen Nukleolin-Antikörper, sowie einem Ku86-Antikörper, der freundlicherweise von S. Medunjanin (Uni Magdeburg) zur Verfügung gestellt wurde. Abbildung 4-7 zeigt ein deutliches Signal sowohl für Nukleolin als auch für Ku86 in den HDGF-Eluaten, nicht aber in den Mock-transfizierten Kontrollen. Der Western Blot bestätigte daher die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen in Bezug auf Nukleolin und Ku86. Zu den weiteren identifizierten Proteinen, die ebenfalls als spezifische Bindungspartner in der Massenspektrometrie identifiziert wurden, stand leider kein Antikörper zur Verfügung.

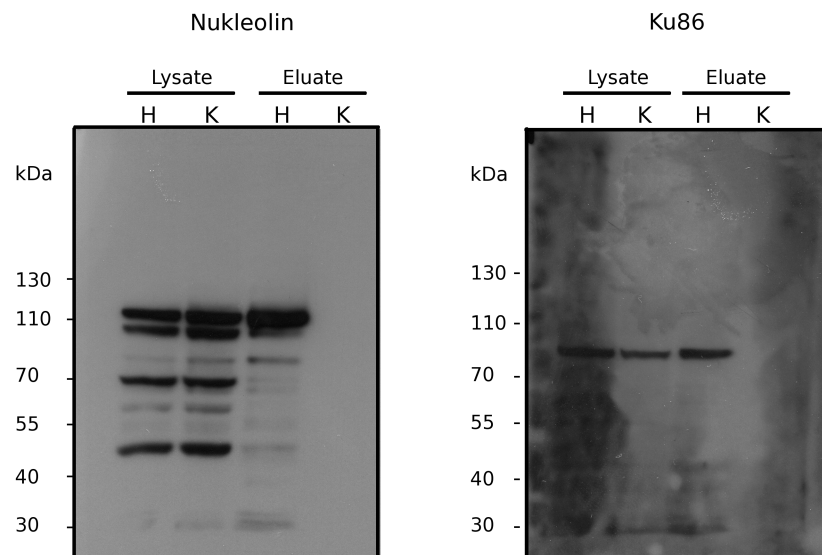


Abbildung 4-7: Identifizierung von Nukleolin und Ku86 im Western Blot.

Lysate und Eluate einer Aufreinigung mit Strep-Tactin MacroPrep Z-Säulen wurden sowohl für HDGF Strep-tag als auch für die Mock-Aufreinigung auf ein SDS-Gel (10 %) aufgetragen und im Western Blot untersucht. Nukleolin konnte bei 110 kDa und Ku86 bei 90 kDa in beiden Ausgangslysaten, jedoch nur in den HDGF-Eluat-Fractionen detektiert werden. Zur Detektion von Nukleolin wurde ein monoklonaler Maus-anti-Nukleolin Antikörper, für Ku86 ein monoklonaler Ziege-anti-Ku86 Antikörper verwendet. HDGF Strep-tag wurde mit Peroxidase gekoppeltem StrepTactin detektiert. Der Nachweis der Antikörper und des StrepTactins erfolgte mit Hilfe der verstärkten Chemilumineszenz (ECL).

4.4 Untersuchungen zur Interaktion von HDGF und Nukleolin

4.4.1 Immunzytochemische Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von HDGF und Nukleolin

Aufgrund der Ergebnisse aus der Massenspektrometrie und der Western Blot-Analyse sollte im weiteren Verlauf der Arbeit die Untersuchung der Interaktion von HDGF und Nukleolin im Vordergrund stehen. Dafür wurden zunächst immunzytochemische Untersuchungen zur Lokalisierung der beiden Proteine in der Zelle durchgeführt. HDGF wird aufgrund seiner zwei nukleären Lokalisationssequenzen überwiegend im Kern exprimiert¹⁹. Ein geringer Prozentsatz an Zellen zeigt jedoch neben der nukleären Lokalisation auch eine

Expression von HDGF im Zytoplasma der Zelle. Nukleolin ist ein Protein der Nukleoli und wird daher ebenfalls überwiegend im Kern exprimiert. Zu einem geringen Anteil kann Nukleolin jedoch zwischen Nukleus, Zytoplasma und der Zellmembran wechseln⁵⁴. In Abbildung 4-8 ist das Ergebnis der immunzytochemischen Untersuchung zur Lokalisation von HDGF und Nukleolin in HeLa-Zellen gezeigt. Bei der Färbung von sowohl endogenem HDGF als auch Nukleolin war zu sehen, dass der Nukleolin-Antikörper eine charakteristische deutliche Färbung der Nukleoli sowie eine Färbung des Nukleus zeigte. Der HDGF-Antikörper zeigte ebenfalls eine deutliche Färbung des Zellkerns. Zu einem geringen Anteil konnten jedoch auch Zellen beobachtet werden, die sowohl HDGF als auch Nukleolin im Zytoplasma der Zelle exprimierten.

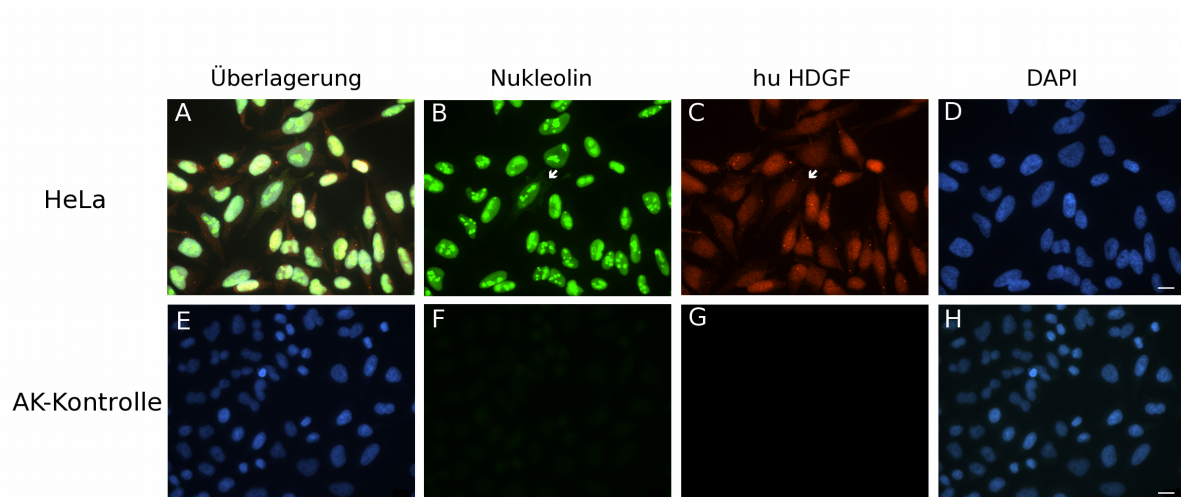


Abbildung 4-8: Immunzytochemische Untersuchung zur Lokalisation von endogenem HDGF und Nukleolin.

HeLa-Zellen wurden fixiert und HDGF mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-HDGF Antikörper (A, C und G) und Nukleolin mit einem Maus-anti-Nukleolin Antikörper (A, B und F) detektiert. Es ist zu sehen, dass die endogene Expression von Nukleolin überwiegend in den Nukleoli und im Nukleus detektiert werden kann. Für HDGF kann ebenfalls eine vorwiegend nukleäre Expression gezeigt werden. In wenigen Zellen ist eine Expression von HDGF und Nukleolin gemeinsam im Zytoplasma zu erkennen (B und C, Pfeile in weiß). Die Maßstabsbalken entsprechen 10 µm.

HeLa-Zellen, die mit einer kodierenden Sequenz für murines HDGF transfiziert wurden, zeigten ebenfalls zu einem geringen Prozentsatz eine zytoplasmatische HDGF-Färbung (Abbildung 4-9). In diesen Zellen konnte beobachtet werden, dass die Nukleolin-Expression nicht nur auf den Zellkern beschränkt war, sondern darüberhinaus auch im Zytoplasma zu detektieren war.

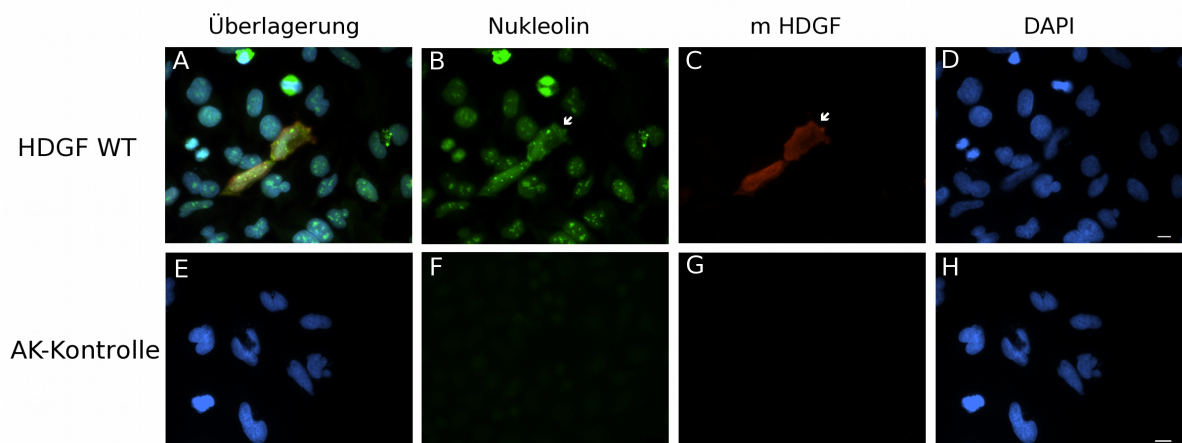


Abbildung 4-9: Immunzytochemische Untersuchung zur Lokalisation von transfiziertem HDGF und endogenem Nukleolin.

HeLa-Zellen wurden mit einer cDNA, die für murines HDGF kodiert, transfiziert und 48 h nach der Transfektion fixiert. Murines HDGF wurde mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-HDGF Antikörper (A und C), der spezifisch nur das murine und damit das transfizierte HDGF erkennt, detektiert. Nukleolin wurde mit einem Maus-anti-Nukleolin Antikörper (A und B) detektiert. Es ist zu sehen, dass die endogene Expression von Nukleolin überwiegend in den Nukleoli und im Nukleus detektiert werden kann. Für das transfizierte murine HDGF kann sowohl eine nukleäre als auch eine zytoplasmatische Expression gezeigt werden. In Zellen, in denen HDGF im Zytoplasma lokalisiert war, konnte auch für Nukleolin eine Expression im Zytoplasma beobachtet werden (B und C, Pfeile in weiß). Die Maßstabsbalken entsprechen 10 µm.

Um diesen Effekt näher zu untersuchen und statistisch auswerten zu können, wurde eine Mutante der nukleären Lokalisations-Sequenz 2 (NLS 2) von HDGF in HeLa-Zellen exprimiert. Wie in Abbildung 4-10 zu sehen ist, wurde in diesen Zellen HDGF überwiegend im zytoplasmatischen Kompartiment exprimiert.

Damit korrelierend konnte eine ebenfalls verstärkte zytoplasmatische Lokalisation von Nukleolin festgestellt werden. Es kam zur Auflösung der deutlichen Nukleoli-Expression, an deren Stelle eine diffuse nukleäre und zytoplasmatische Verteilung des Proteins in der Zelle trat (Pfeile in weiß).

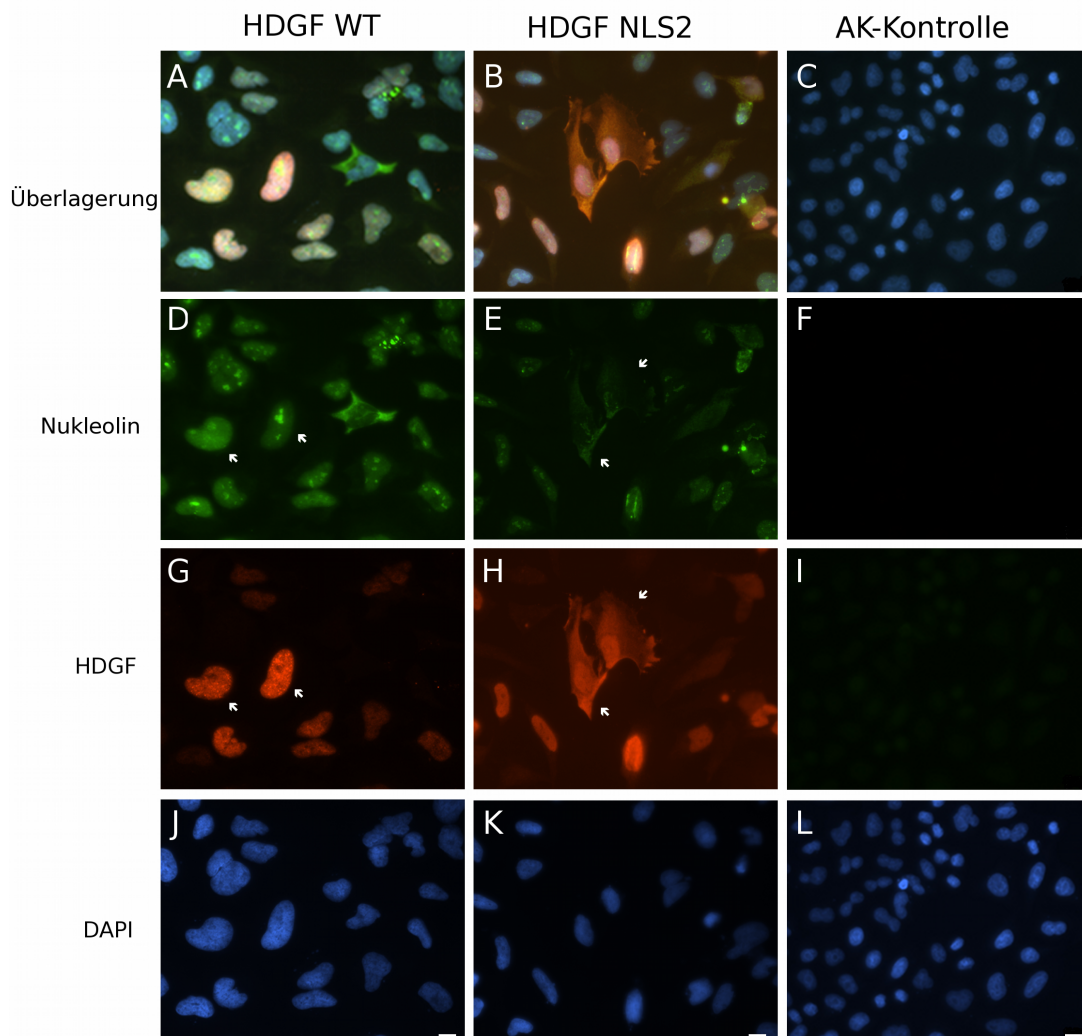


Abbildung 4-10: Lokalisation von Nukleolin in Abhängigkeit von HDGF WT und einer NLS 2-Mutante.

HeLa-Zellen wurden mit HDGF Wildtyp (WT) oder einer Mutante des zweiten nukleären Lokalisationssignals von HDGF (HDGF NLS 2) transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und HDGF mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-HDGF sowie Nukleolin mit einem monoklonalen Maus-anti-Nukleolin-Antikörper detektiert. Zur Darstellung des Nukleus wurde DAPI verwendet. In G und D ist zu sehen, dass diejenigen Zellen, die HDGF nukleär

exprimierten, ebenfalls eine überwiegend nukleäre Expression von Nukleolin aufwiesen. Pfeile in weiß verdeutlichen diesen Sachverhalt. Wird HDGF durch eine Mutation in der NLS 2-Sequenz verstärkt außerhalb des Nukleus exprimiert, kann in diesen Zellen auch ein Wechsel der Lokalisation für Nukleolin festgestellt werden (E und H, Pfeile in weiß). In den Zellen mit zytoplasmatischer HDGF-Expression war auch Nukleolin verstärkt im Zytoplasma der Zellen lokalisiert. Die Maßstabsbalken in weiß entsprechen jeweils 10 µm.

Die Beobachtungen der immunzytochemischen Untersuchungen sollten im Folgenden statistisch ausgewertet werden. Dafür wurden für jeden experimentellen Ansatz HDGF positive Zellen auf die Lokalisation von Nukleolin in der Zelle untersucht. Wie in Abbildung 4-11 A zu sehen ist, zeigten nur 7 % der Zellen, die die Wildtyp HDGF-Variante exprimierten, eine zytoplasmatische Lokalisation von Nukleolin. Im Vergleich dazu zeigten Zellen, die die HDGF NLS 2-Variante exprimierten, zu 66 % eine zytoplasmatische Lokalisation von Nukleolin. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Chi-Quadrat-Vierfeldertestes. Dargestellt sind in B exemplarisch zwei Experimente bei denen die absolut ermittelten Zellzahlen im Chi-Quadrat-Vierfeldertest untersucht wurden. Es ergab sich bei beiden ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von <0.001 .

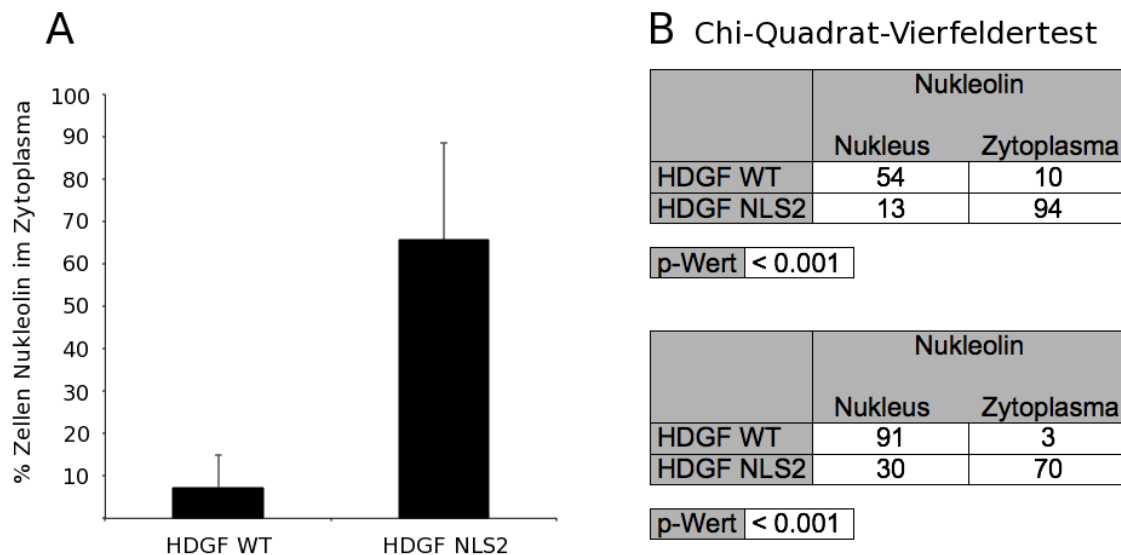


Abbildung 4-11: Statistische Auswertung der Lokalisation von Nukleolin in Abhängigkeit von HDGF in HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden mit murinem Wildtyp HDGF (WT) oder mit der HDGF NLS 2-Mutante (NLS 2) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen fixiert und das transfizierte HDGF mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-HDGF Antikörper, das endogene Nukleolin mit einem monoklonalen Maus-anti-Nukleolin Antikörper detektiert. In der immunzytochemischen Färbung wurden anschließend jeweils HDGF positive Zellen hinsichtlich ihrer Lokalisation von Nukleolin analysiert. Aufgetragen in A ist der prozentuale Anteil der Zellen, die eine Lokalisation von Nukleolin im Zytoplasma zeigten. Bei der Expression von Wildtyp HDGF zeigten 7 % der Zellen eine zytoplasmatische Lokalisation von Nukleolin. Im Vergleich dazu zeigten 66 % der mit der HDGF NLS 2-Mutante transfizierten Zellen eine Lokalisation im Zytoplasma. Die Signifikanz wurde mit den absoluten Zellzahlen im Chi-Quadrat Vierfelder-Test überprüft (B) (Anzahl der Experimente n=3).

4.4.2 Untersuchung der Koreinigung von Nukleolin in Abhängigkeit der HDGF NLS 2-Variante

Da die zytoplasmatische Expression der NLS 2-Mutante von HDGF zu einer verstärkten zytoplasmatischen Lokalisation von endogenem Nukleolin führte, sollte untersucht werden, ob eine Aufreinigung mit der NLS 2-Mutante auch zu einer verstärkten Koreinigung von Nukleolin führt. Dafür wurden die Fusionsproteine von HDGF Wildtyp sowie der NLS 2-Mutante mit Strep-tag in

HeLa-Zellen exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte anschließend mit Strep-Tactin MacroPrep Beads und die Eluate wurden im Western Blot analysiert. Wie in Abbildung 4-12 zu sehen ist, war die Menge an kogereinigtem Nukleolin in beiden Proben nahezu äquivalent. Die verstärkte zytoplasmatische Expression der beiden Proteine führte damit nicht zu einer verstärkten Koreinigung von Nukleolin.

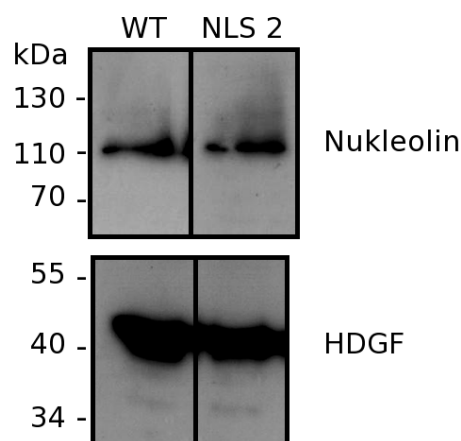


Abbildung 4-12: Koreinigung von Nukleolin in Abhängigkeit der NLS 2-Mutante von HDGF.

HeLa-Zellen wurden mit kodierenden Sequenzen für murines Wildtyp HDGF (WT) sowie einer NLS 2-Mutante von HDGF (NLS 2) transfiziert. Die Strep-tag Fusionsproteine wurden anschließend über Strep-Tactin MacroPrep Beads aufgereinigt und die Eluate im Western Blot untersucht. Es ist zu sehen, dass die Menge an kogereinigtem Nukleolin in beiden Proben nahezu gleich war. Die Aufreinigung von HDGF erfolgte dabei in nahezu äquivalenten Mengen. Nukleolin wurde mit einem monoklonalen Maus-anti-Nukleolin Antikörper detektiert. Für HDGF wurde ein polyklonaler Kaninchen-anti-HDGF Antikörper verwendet. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit Hilfe der verstärkten Chemilumineszenz (ECL).

4.4.3 Abhängigkeit der HDGF-Nukleolin-Interaktion von RNA

Es ist bekannt, dass zahlreiche Protein-Interaktionen von der Anwesenheit von RNA abhängig sind. Für Nukleolin konnte dieser Zusammenhang bereits in einigen Studien gezeigt werden^{55,56}. Daher sollte überprüft werden, ob auch die Interaktion von HDGF und Nukleolin auf die Anwesenheit von RNA angewiesen

ist. Dafür wurden HEK 293-Zellen mit HDGF Strep-tag oder einem Kontrollplasmid transfiziert und die Lysate vor der Aufreinigung mit und ohne RNase A über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Lysate wurden anschließend über Strep-Tactin MacroPrep Z-Säulen aufgereinigt und die Eluate im Western Blot untersucht.

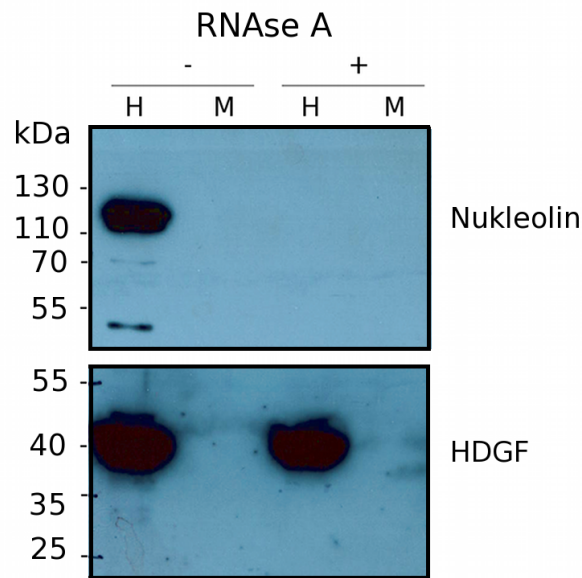


Abbildung 4-13: Einfluss von RNase A auf den Proteinkomplex von HDGF und Nukleolin.

HEK 293-Zelllysate wurden vor der affinitätschromatographischen Aufreinigung mit und ohne 25 µg/ml RNase A über Nacht inkubiert. Die Analyse der Eluat-Fractionen erfolgte im Western Blot. Nukleolin wurde mit einem monoklonalen Maus-anti-Nukleolin Antikörper, HDGF mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-HDGF Antikörper detektiert. Es ist festzustellen, dass Nukleolin in der HDGF-Eluat Fraktion (H), die vor der Aufreinigung mit RNase A behandelt wurde, nicht mehr detektiert werden konnte. In der Mock-behandelten Probe, konnte Nukleolin dagegen mit HDGF kogereinigigt werden. Die Aufreinigung für HDGF war dagegen nicht abhängig von einer Behandlung der Lysate mit RNase A. HDGF-Eluat-Fraktion (H), Mock-Eluat-Fraktion (M). Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit Hilfe der verstärkten Chemilumineszenz (ECL).

Wie in Abbildung 4-13 zu sehen ist, zeigte eine Untersuchung der Eluate im Western Blot, dass die Koreinigung von HDGF und Nukleolin bei vorheriger Inkubation der Lysate mit RNase A vollständig verhindert werden konnte. Es kann daher festgehalten werden, dass die Interaktion von HDGF und Nukleolin abhängig von der Anwesenheit von RNA ist.

4.4.3.1 Behandlung der HEK 293-Zellen mit Paclitaxel

Unterschiedliche Studien haben sowohl für Nukleolin als auch HDGF einen Einfluss auf die zelluläre Bcl-2 mRNA-Menge nachgewiesen. Es konnte darüberhinaus gezeigt werden, dass eine Behandlung von HL-60 Zellen mit Paclitaxel (Taxol®) zu einer Destabilisierung der Bcl-2 mRNA führt. Unter dieser Behandlung ist auch die Bindung von Nukleolin und anderer RNA-bindender Proteine an die 3'UTR und damit die Stabilisierung der Bcl-2 mRNA nicht mehr effizient⁵⁷. Sollte die Interaktion von HDGF und Nukleolin unter anderem von der Anwesenheit der Bcl-2 mRNA abhängig sein, sollte demnach eine Behandlung der Zellen mit Paclitaxel zu einer Reduktion der beobachteten Koreinigung von Nukleolin mit HDGF Strep-tag führen. Dieser Versuch sollte daher einen ersten Hinweis geben, ob die Interaktion von HDGF und Nukleolin über die Bcl-2 mRNA verläuft. Dafür wurden HEK 293-Zellen mit 200 nM Paclitaxel (gelöst in DMSO), nur DMSO oder unbehandelte Zellen in Kulturmedium für 16 h inkubiert. Die Zelllysate wurden anschließend über Strep-Tactin MacroPrep Z-Säulen aufgereinigt und im Western Blot untersucht. Wie Abbildung 4-14 zeigt, nahm die Menge an kogereinigtem Nukleolin in den mit Paclitaxel behandelten Proben ab. Die Menge an aufgereinigtem HDGF dagegen war in allen Proben unverändert.

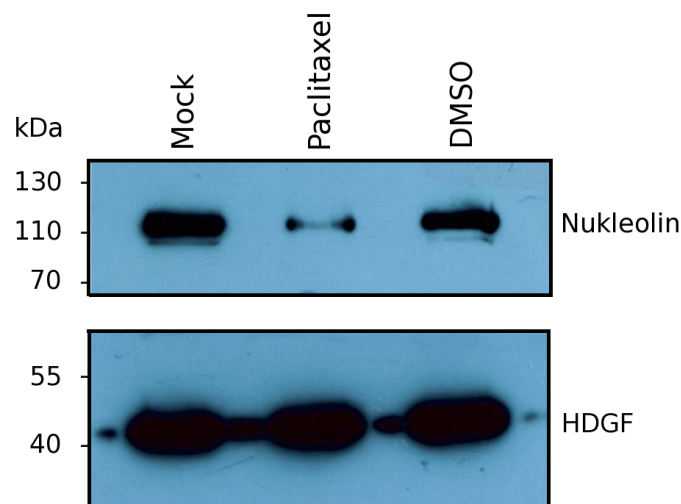


Abbildung 4-14: Destabilisierung des HDGF-Nukleolin Proteinkomplexes durch Paclitaxel.

HEK 293-Zellen wurden mit 200 nM Paclitaxel, DMSO oder unbehandelt für 16 h bei 37 °C inkubiert. HDGF Strep-tag aus den Zelllysaten wurde anschließend über Strep-Tactin MacroPrep Z-Säulen aufgereinigt und die Eluat-Fractionen im Western Blot untersucht. Aufgetragen sind in dieser Abbildung äquivalente Mengen der Eluat-Fractionen. Das HDGF Fusionsprotein wurde mit Peroxidase gekoppeltem StrepTactin detektiert. Für die Detektion von Nukleolin wurde ein monoklonaler Maus-anti-Nukleolin Antikörper verwendet. Es ist zu sehen, dass die Behandlung der Zellen mit Paclitaxel vor der Aufreinigung zu einer verminderten Koreinigung von Nukleolin führte. Die Behandlung mit DMSO hatte dagegen keine Auswirkungen auf die Menge an kogereinigtem Nukleolin. Die Aufreinigung von HDGF war in allen Proben unverändert. Die Detektion der gebundenen Antikörper sowie des StrepTactins erfolgte mit Hilfe der verstärkten Chemilumineszenz (ECL).

4.5 Untersuchungen zum Einfluss von Bcl-2 auf die Interaktion von HDGF und Nukleolin

4.5.1 Einfluss der Überexpression von HDGF auf die Expressionshöhe von Bcl-2 auf mRNA und Proteinebene

Für HDGF konnte in einem Knock-down Ansatz mit einer siRNA gegen HDGF gezeigt werden, dass die Abnahme von HDGF mit einer Abnahme der Expression von Bcl-2 in der Zelle korreliert³⁸. Für Nukleolin konnte in Studien gezeigt werden, dass es auf einem AU-reichen Element (ARE) innerhalb der

3'UTR von Bcl-2 binden kann und dadurch zu einer Stabilisierung der mRNA führt^{58,59}.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Behandlung von Zellen mit Paclitaxel zu einem Rückgang der Interaktion von HDGF und Nukleolin führt, sollte der direkte Einfluss einer Überexpression von HDGF auf die mRNA von Bcl-2 untersucht werden. Dafür wurden HeLa-Zellen mit der kodierenden Sequenz von murinem Wildtyp HDGF, der HDGF NLS 2-Mutante oder einer Mock-Kontrolle (Leervektor pCDNA3) transfiziert und nach 48 h die RNA isoliert. Nach der cDNA-Synthese wurde für diese Proben eine quantitative Real-time PCR mit Primern für die Bcl-2 mRNA sowie Primern für humanes GAPDH, welches zur Normalisierung verwendet wurde, durchgeführt. In Abbildung 4-15 A ist die relative Expressionshöhe der Bcl-2 mRNA in Abhängigkeit von der Überexpression der verschiedenen HDGF-Konstrukte dargestellt. Es konnte festgestellt werden, dass die Überexpression von Wildtyp-HDGF in HeLa-Zellen zwar zu einer 1,8 fachen Erhöhung der relativen Expressionshöhe der Bcl-2 mRNA führte, diese aber nicht signifikant war. Bei einer Überexpression der HDGF NLS 2-Mutante dagegen kam es lediglich zu einer 1,07 fachen, ebenfalls nicht signifikanten Erhöhung.

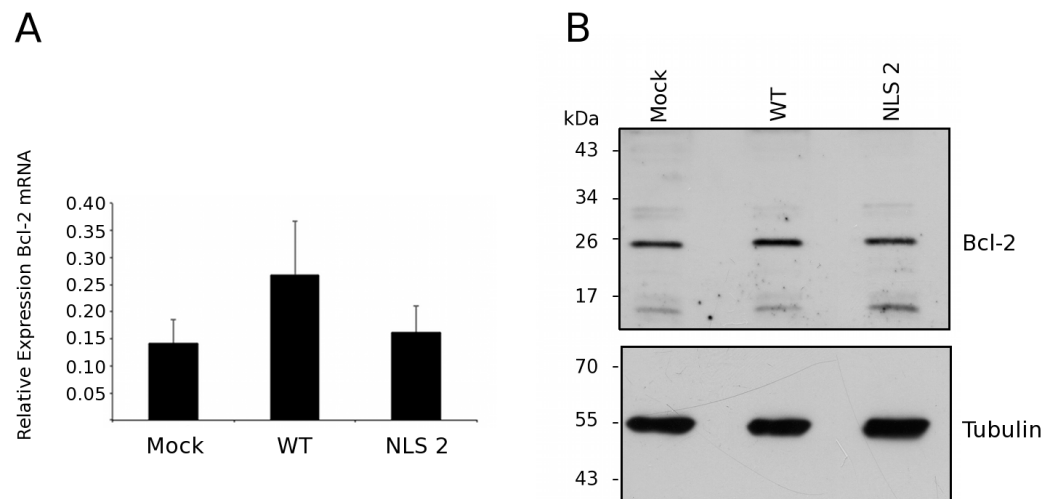


Abbildung 4-15: Expressionsanalyse von Bcl-2 auf mRNA und Protein-Ebene in Abhängigkeit von HDGF.

In A wurden HeLa-Zellen mit HDGF Wildtyp (WT), der HDGF NLS 2-Variante (NLS 2) sowie einer Leervektor-Kontrolle (Mock) transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die RNA aus den Zellen isoliert und eine quantitative Real-time PCR mit Primern für die Bcl-2 mRNA sowie GAPDH durchgeführt. Die erhaltenen Werte für Bcl-2 wurden gegen die ermittelten Werte für GAPDH normalisiert. Es ist festzustellen, dass der relative Expressionsspiegel der Bcl-2 mRNA bei einer Überexpression von Wildtyp-HDGF um das 1,8 fache erhöht ist. Im Gegensatz dazu ist der Spiegel der mRNA bei einer Überexpression der NLS 2-Mutante nicht erhöht (1,07 fach). Beides war jedoch nicht signifikant. In B wurden HeLa-Zellen 72 h nach Transfektion geerntet und 50 µg der Zelllysate im Western Blot untersucht. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Die densitometrische Quantifizierung des Bcl-2 Signals ergab keine signifikante Erhöhung von Bcl-2 auf Proteinebene. Bcl-2 wurde mit einem Kaninchen-anti-Bcl-2 Antikörper detektiert, für Tubulin wurde ein monoklonaler Maus-anti-αTubulin Antikörper verwendet. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit Hilfe der verstärkten Chemilumineszenz (ECL).

Es sollte im Weiteren untersucht werden, ob ein Effekt der HDGF-Überexpression auf Proteinebene von Bcl-2 festzustellen ist. Dafür wurden HeLa-Zellen mit HDGF-WT und der NLS 2-Mutante transfiziert und nach 72 h geerntet. Äquivalente Mengen Gesamtprotein der Zelllysate wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und im Western Blot untersucht. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Wie in Abbildung 4-15 B zu sehen ist, konnte bei der Expression von Bcl-2 auf Proteinebene keine Erhöhung in Abhängigkeit einer Überexpression von HDGF festgestellt werden.

4.5.2 Untersuchung der Interaktion von HDGF und Nukleolin in Abhängigkeit verschiedener Bcl-2 Konstrukte in HeLa-Zellen

Um zu untersuchen, ob eine Überexpression von Bcl-2 wiederum einen Einfluss auf den Komplex von HDGF und Nukleolin ausübt, wurden verschiedene Bcl-2 Konstrukte kloniert und in HeLa-Zellen zusammen mit dem HDGF Strep-tag Fusionsprotein überexprimiert. Die Lysate wurden anschließend über Strep-Tactin MacroPrep Beads aufgereinigt und die Eluate im Western Blot untersucht. In Abbildung 4-16 A sind schematisch die Bcl-2 Konstrukte dargestellt, die für die Analyse der Koreinigung von Nukleolin verwendet wurden. Dabei wurde ein Volllängen-Konstrukt (VL) bestehend aus der 5'UTR, der kodierenden Sequenz (cds) sowie der 3'UTR von Bcl-2 als Ausgangskonstrukt verwendet. Davon ausgehend wurden verschiedene Deletionskonstrukte kloniert. Wie in B zu erkennen ist, wurden alle Konstrukte äquivalent exprimiert und konnten für weitere Analysen verwendet werden.

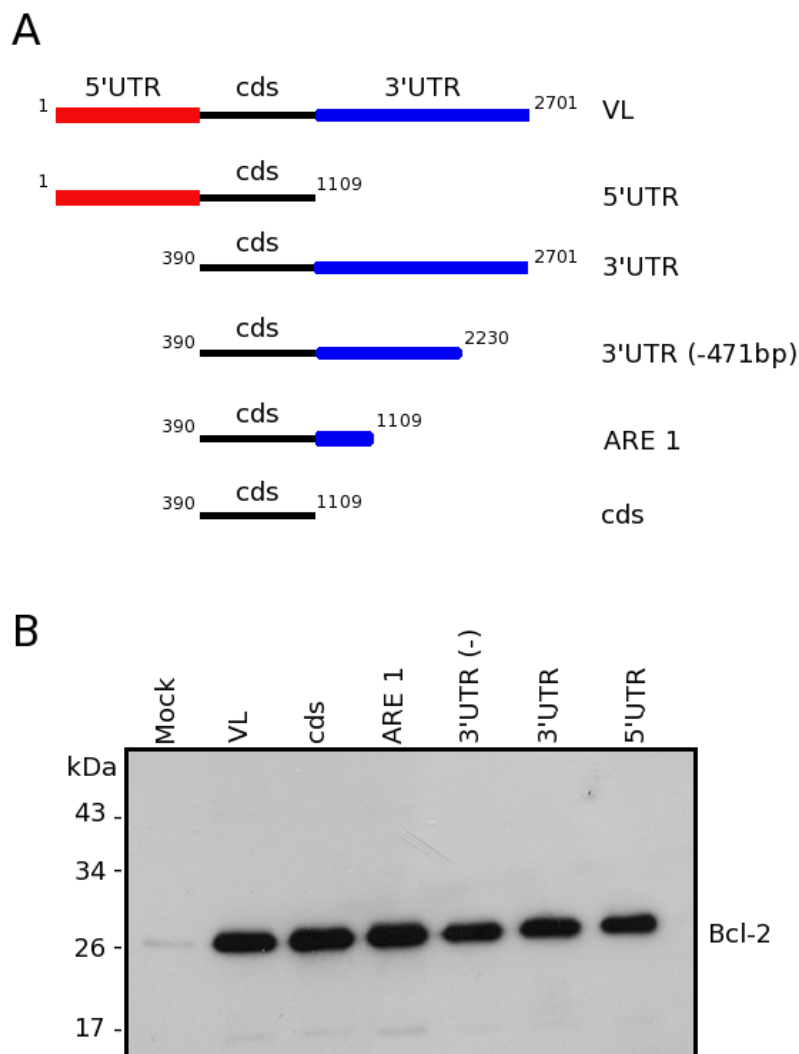


Abbildung 4-16: Schematische Darstellung und Expression der Bcl-2 Konstrukte.

Es wurden, wie in A schematisch dargestellt, verschiedene Bcl-2 mRNA Konstrukte kloniert. Mit Hilfe dieser Konstrukte sollte die Abhängigkeit der Interaktion von HDGF und Nukleolin von der Bcl-2 mRNA untersucht werden. Dafür wurde ein Volllängen-Konstrukt (VL) bestehend aus 5'UTR, der kodierenden Sequenz (cds) und 3'UTR, sowie verschiedene Deletionskonstrukte erzeugt: 5'UTR+cds (5'UTR), cds+3'UTR (3'UTR), cds +3'UTR ohne die letzten 471 bp (3'UTR(-)), cds+3'UTR ARE1 (ARE 1) sowie nur die cds von Bcl-2. Zur Kontrolle der Expression dieser Konstrukte wurden äquivalente Mengen der Lysate auf eine SDS-Gel (4-20 %) aufgetragen und im Western Blot untersucht. Wie in B zu sehen ist, war die exprimierte Bcl-2 Proteinmenge der verschiedenen Konstrukte als nahezu äquivalent anzusehen. Bcl-2 wurde mit einem monoklonalen Kaninchen-anti-Bcl-2 Antikörper detektiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit Hilfe der verstärkten Chemilumineszenz (ECL).

Vor der Analyse der Eluate wurde zunächst der Einfluss der Bcl-2 Konstrukte auf die HDGF-Expression untersucht. Dafür wurden äquivalente Mengen

Gesamtprotein der Lysate auf ein SDS-Gel aufgetragen. HDGF und Tubulin als Referenzprotein wurden im Western Blot über fluoreszierende Zweitantikörper im Infrarot-Odyssee Scanner visualisiert und das Signal quantitativ ausgewertet.

Wie in Abbildung 4-17 zu sehen ist, war die Expression von transfiziertem HDGF abhängig von der Kotransfektion und damit der Expression der verschiedenen Bcl-2 Konstrukte. Die Expression von Vollängen-Bcl-2 führte zu einer 7fachen Steigerung der HDGF-Proteinmenge, wohingegen die Expression der cds von Bcl-2 die HDGF-Menge bis auf eine nicht-detektierbare Menge bei 20 µg Gesamtprotein reduzierte. Wurde jedoch ein Bcl-2 Konstrukt exprimiert, bei dem entweder die 5' oder die 3'UTR an die cds von Bcl-2 angehängen wurde, konnte die HDGF-Menge wieder gesteigert werden.

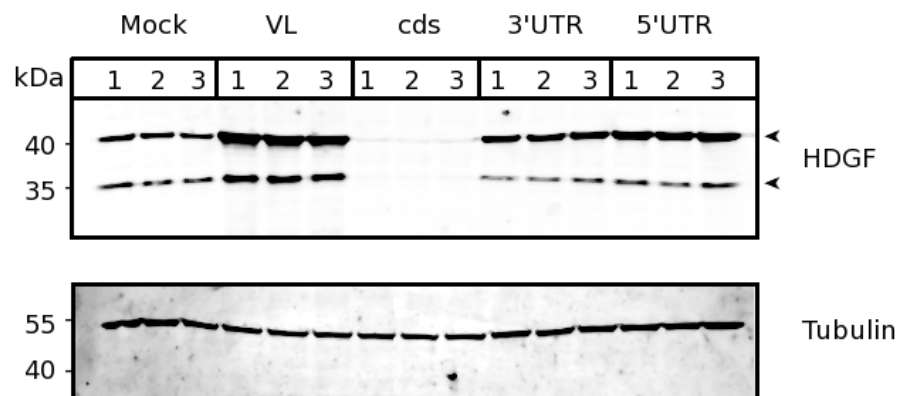


Abbildung 4-17: Quantifizierung der HDGF-Expression in Abhängigkeit verschiedener Bcl-2 Konstrukte.

HeLa-Zellen wurden mit HDGF Strep-tag sowie verschiedenen Bcl-2-Konstrukten oder einer Mock-Kontrolle kotransfiziert. 20 µg Gesamtprotein der Lysate von jeweils 3 biologischen Replikaten (1-3) wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen. Transfiziertes HDGF wurde mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-HDGF Antikörper detektiert. Zur Ladekontrolle wurde Tubulin mit einem monoklonalen Maus-anti-Tubulin Antikörper detektiert. Die Menge gebundener Antikörper wurde mit Hilfe von spezifischen Fluoreszenz gekoppelten sekundären Antikörpern und einem Odyssee Fluoreszenzscanner quantifiziert. Es ist zu sehen, dass die HDGF-Expression bei gleichzeitiger Kotransfektion der Vollängen-mRNA von Bcl-2 (VL) um das 7fache im Vergleich zur Mock-Kontrolle (Leervektor) zunahm. Die Kotransfektion der cds von Bcl-2 führte dagegen zu einem starken Rückgang der HDGF-Expression. Durch das Anhängen sowohl der 3'UTR als auch der 5'UTR an die cds von Bcl-2 konnte dieser Effekt verhindert werden.

Für die Analyse der Koreinigung von Nukleolin in Abhängigkeit von Bcl-2 wurden HeLa-Zellen mit HDGF Strep-tag sowie den jeweiligen Bcl-2 Konstrukten kotransfiziert. Die Lysate wurden hinsichtlich der HDGF Menge quantifiziert, so dass äquivalente Mengen an HDGF anschließend über Strep-Tactin MacroPrep Beads aufgereinigt werden konnten. Es wurden gleiche Mengen an Eluat-Fractionen auf ein SDS-Gel aufgetragen und im Western Blot untersucht. Wie in Abbildung 4-18 zu sehen ist, konnte Nukleolin in der Mock kotransfizierten Probe nur zu einem sehr geringen Anteil kogereinigt werden. Im Gegensatz dazu führte die Kotransfektion des Vollängen-Bcl-2 Konstruktes (VL) zu einer deutlichen Zunahme des kogereinigten Nukleolins. Überraschenderweise konnte durch die Kotransfektion der codierenden Sequenz (cds) von Bcl-2 eine Interaktion von HDGF und Nukleolin vollständig verhindert werden. Auf diesen Befund aufbauend wurde nun der Bereich der mRNA von Bcl-2 gesucht, welcher für die Vermittlung der Interaktion von HDGF und Nukleolin notwendig ist. Das ARE1-Konstrukt entsprach der nächstgrößeren Einheit im Vergleich zur cds alleine. Dafür wurden 405 bp der 3'UTR an die cds angehängen. Dieses Element konnte bereits als Bindungsmotif für Nukleolin auf der 3'UTR der Bcl-2 mRNA identifiziert werden⁵⁸. Es ist zu sehen, dass der Anhang dieser 405 bp ausreichte, um eine Koreinigung von Nukleolin zu ermöglichen. Auch ein weiteres Deletionskonstrukt der 3'UTR, dem die letzten 471 bp fehlten sowie die vollständige 3'UTR ergaben das gleiche Ergebnis. Überraschenderweise konnte eine Koreinigung von Nukleolin auch dann erzielt werden, wenn nur die 5'UTR an die cds angehängt wurde. Es ist also festzuhalten, dass die Interaktion von HDGF und Nukleolin in HeLa-Zellen sowohl von der 5' als auch der 3'UTR der mRNA von Bcl-2 vermittelt werden kann.

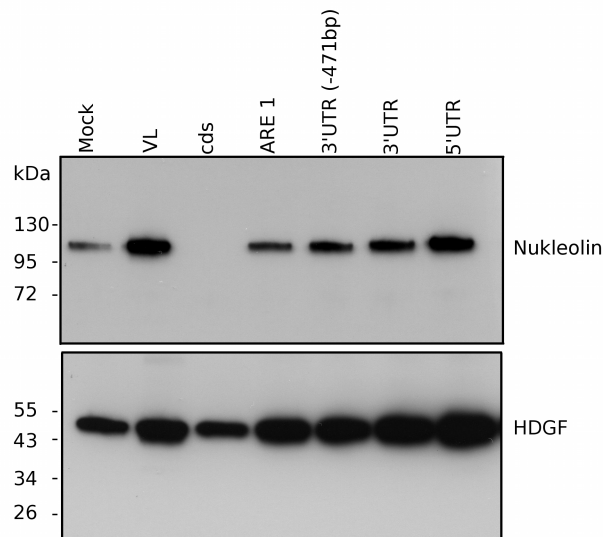


Abbildung 4-18: Abhängigkeit der Interaktion von HDGF und Nukleolin von der Bcl-2 mRNA.

HDGF Strep-tag wurde mit den verschiedenen Bcl-2 Varianten in HeLa Zellen exprimiert. Die Lysate wurden anschließend über Strep-Tactin MacroPrep Beads aufgereinigt und die Eluate zur Analyse auf ein SDS-Gel (4-20 %) aufgetragen. Die Analyse im Western Blot zeigte zunächst, dass die Menge an kogereinigtem Nukleolin durch Expression des Bcl-2 Volllängen Konstruktes (VL) im Vergleich zur Mock-transfizierten Kontrolle (Mock) gesteigert werden konnte. Die Expression der kodierenden Sequenz (cds) von Bcl-2 führte hingegen zu einem vollständigen Verlust der Koreinigung von Nukleolin. Des Weiteren kann festgestellt werden, dass schon der Anhang von 405 bp der 3'UTR (ARE1) an die cds von Bcl-2 ausreichte, um die Koreinigung von Nukleolin zu ermöglichen. Ebenfalls konnte die Koreinigung von Nukleolin durch Anhang der 5'UTR an die cds von Bcl-2 erreicht werden. Die Aufreinigung von HDGF erfolgte in annähernd äquivalenten Mengen. Nukleolin wurde mit einem monoklonalen Maus-anti-Nukleolin Antikörper, HDGF mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-HDGF Antikörper detektiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit Hilfe der verstärkten Chemilumineszenz (ECL).

Als nächstes stellte sich die Frage, inwiefern die kodierende Sequenz der Bcl-2 mRNA an der Koreinigung von HDGF und Nukleolin beteiligt ist. Dafür wurde die kodierende Sequenz von Bcl-2 gegen die kodierende Sequenz der sekretierten alkalischen Phosphatase (SEAP) ausgetauscht, so dass ein Konstrukt bestehend aus der 5' und 3'UTR von Bcl-2 mit der kodierenden Sequenz von SEAP erzeugt wurde. Wie in Abbildung 4-19 zu sehen ist, konnte der Effekt der Volllänge von Bcl-2 (VL) mit der Volllänge von SEAP (VL SEAP) nicht erreicht werden. Eine gesteigerte Menge an kogereinigtem Nukleolin war nur in der VL-Probe, bestehend aus 5' und 3'UTR sowie der cds von Bcl-2 zu

detektieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Menge der Bcl-2 mRNA in der Zelle sowohl in der VL- als auch in der VL SEAP-Probe erhöht war. Es ist daher festzustellen, dass die kodierende Sequenz der Bcl-2 mRNA notwendig ist, um eine effiziente Bildung des HDGF-Nukleolin Komplexes zu erreichen.

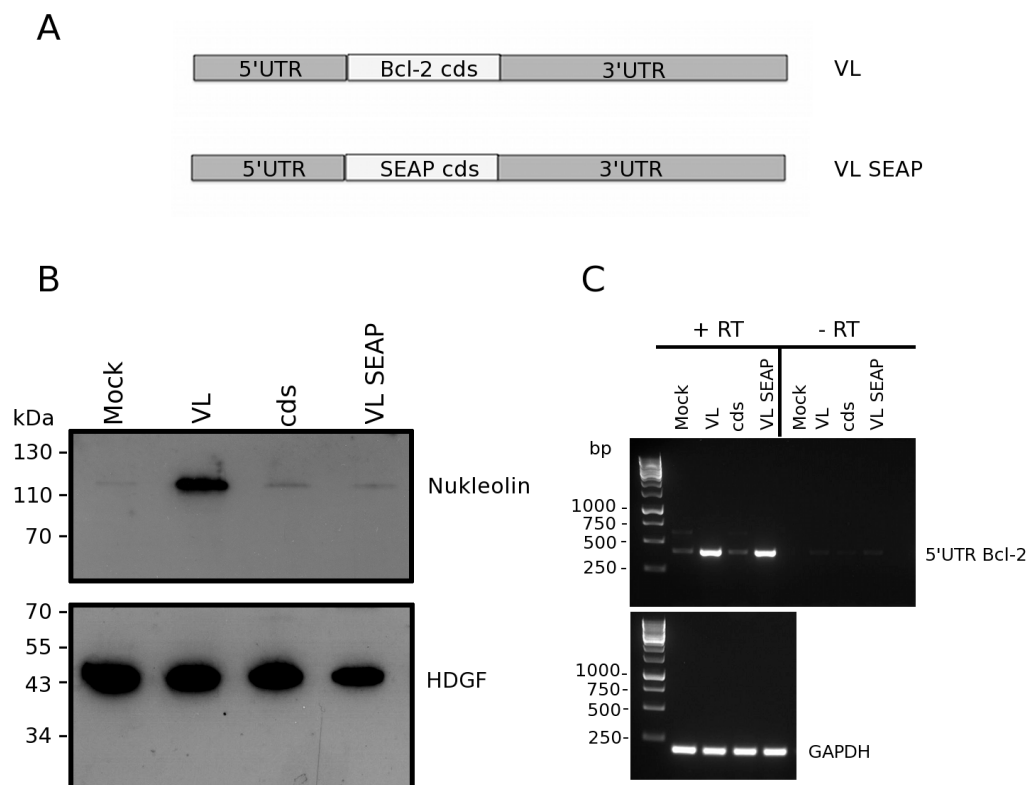


Abbildung 4-19: Einfluss der kodierenden Sequenz von Bcl-2 auf die Koreinigung von Nukleolin und HDGF.

(A) Zur Untersuchung des Einflusses der kodierenden Sequenz der Bcl-2 mRNA auf die Koreinigung von HDGF und Nukleolin, wurde ein Vollängen-Konstrukt der mRNA von Bcl-2 (VL), sowie ein Vollängen-Konstrukt der mRNA von Bcl-2, die die kodierende Sequenz von SEAP anstelle der kodierenden Sequenz von Bcl-2 enthielt (VL SEAP), in HeLa-Zellen exprimiert. Die verwendeten Konstrukte sind hier schematisch dargestellt. (B) HDGF Strep-tag wurde mit den beiden VL-Konstrukten sowie der kodierenden Sequenz von Bcl-2 (cds) und einer Leervektor-Kontrolle (Mock) exprimiert und die Fusionsproteine anschließend über Strep-Tactin MacroPrep Beads aufgereinigt. Die Eluate wurden anschließend im Western Blot untersucht. Es ist zu sehen, dass die Koreinigung von Nukleolin nur bei Expression der VL von Bcl-2 mit der Bcl-2 cds zu einer gesteigerten Koreinigung von Nukleolin führte. Der Austausch gegen die kodierende Sequenz von SEAP führte zu einem Verlust dieser Anreicherung und entsprach der Kontrolle (HDGF Strep-tag mit Leervektor = Mock). Die Detektion von Nukleolin

erfolgte mit einem monoklonalen Maus-anti-Nukleolin Antikörper. HDGF wurde mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-HDGF Antikörper nachgewiesen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit Hilfe der verstärkten Chemilumineszenz. (C) Um nachzuweisen, dass beide VL-Konstrukte zu einer äquivalenten Erhöhung des Bcl-2 mRNA Spiegels führten, wurde RNA aus transfizierten HeLa-Zellen isoliert und eine PCR auf der cDNA sowohl für die 5'UTR von Bcl-2 als auch für GAPDH als Ladekontrolle durchgeführt (+ RT = cDNA-Synthese mit Reverse Transkriptase). Des Weiteren wurde zur Kontrolle eine PCR auf der cDNA durchgeführt, deren Synthese ohne Reverse Transkriptase durchgeführt wurde (- RT = cDNA-Synthese ohne Reverse Transkriptase). Es konnte eine deutliche Steigerung der mRNA-Menge in beiden VL-Proben im Vergleich zur Kontrolle (transfizierter Leervektor = Mock) bzw. zur cds von Bcl-2 (cds) gezeigt werden.

4.5.3 Untersuchung der Zusammensetzung der Eluate von Bcl-2 cds und mRNA mit Hilfe der MaxQuant Analyse

Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von HDGF und Nukleolin durch die Kotransfektion der kodierenden Sequenz (cds) von Bcl-2 alleine verhindert und durch die mRNA von Bcl-2 verstärkt werden konnte. Daraus resultierte die Fragestellung, ob sich generell das Muster der koreinigenden Proteine in diesen Proben unterschied.

In Zusammenarbeit mit Dr. Sebastian Franken wurde die Zusammensetzung der Eluate in der LTQ Orbitrap analysiert und mit der MaxQuant Software (Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried) ausgewertet. Dafür wurden jeweils drei biologische Replikate der Proben wie in 3.3.11 beschrieben aufgereinigt und über die FASP-Methode für die Analyse in der LTQ Orbitrap vorbereitet. Die Daten aus der LTQ Orbitrap wurden dann mit Hilfe der MaxQuant Software analysiert und die Daten in einem Volcano-Plot dargestellt (Abbildung 4-20). Es ist zu sehen, dass sich das Interaktions-Muster zwischen den Proben stark unterschied. In den Eluaten der Bcl-2 Vollängen-Probe (Bcl-2 VL) wurden einige Proteine angereichert, die in den Eluaten der Bcl-2 cds nicht signifikant identifiziert werden konnten. Bei einem dieser Proteine handelte es sich um Nukleolin, wodurch das Ergebnis aus den Western Blot Analysen aus 4.5.2 bestätigt wurde. Des Weiteren wurden Proteine wie Nukleophosmin, ribosomale Proteine wie z.B. das 60S azide ribosomale Protein und Histone wie z.B. Histon H2B Typ1 und Histon H4 und H3 identifiziert. Proteine, die keinen signifikanten

Unterschied zwischen den zwei Proben aufwiesen waren z.B. Streptavidin oder Ku70. Eine Auflistung aller identifizierten Proteine befindet sich im Anhang (Punkt 8.1.4) .

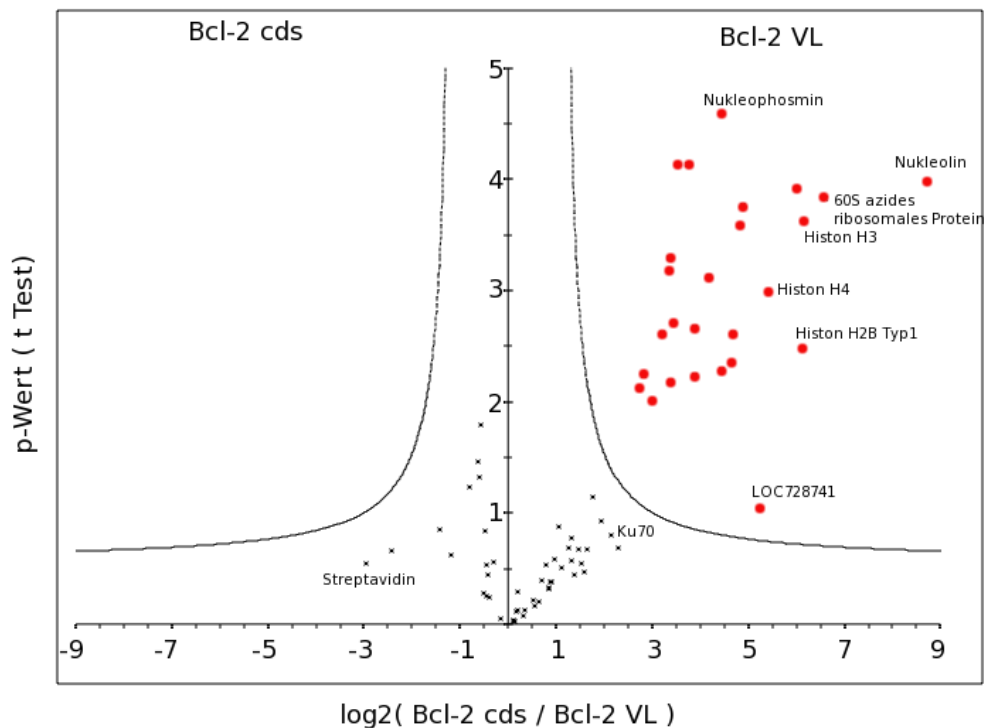


Abbildung 4-20: Untersuchung der Proteinzusammensetzung der Eluate von HDGF Strep-tag mit der Bcl-2 cds oder VL mRNA.

Die Zusammensetzung der Eluate von HDGF Strep-tag mit der Bcl-2 cds oder mRNA wurden in der LTQ Orbitrap untersucht. Die Daten aus jeweils drei biologischen Replikaten wurden mit Hilfe der MaxQuant Software analysiert und das Ergebnis in einem Volcano-Plot dargestellt. Hier ist das logarithmische Verhältnis der Proteinintensitäten ($\log_2(\text{Bcl-2cds}/\text{Bcl-2 mRNA})$) gegen den negativen Logarithmus der p-Werte (P-Wert (T-Test)) des t-Tests der Triplikate aufgetragen. Die hyperbolische Kurve markiert die berechnete Signifikanzgrenze. Die Proteine, die über dieser Kurve liegen waren für die jeweilige Probe als spezifisch angereicherte Proteine anzusehen (Punkte in rot). Bei den Proteintreffern, die unterhalb dieser Kurve liegen, handelte es sich um nicht von der VL mRNA abhängige und daher in beiden Proben gleichermaßen vorkommenden Proteine, wie z.B. Streptavidin oder Ku70 (Punkte in schwarz). Es ist zu sehen, dass in der Bcl-2 VL-Probe Nukleolin, Nukleophosmin, Histon H2B Typ1, Histon H3, Histon H4 und das ribosomale azide 60S Protein unter anderen als signifikante Proteine identifiziert werden konnten. Eine Liste aller identifizierten Proteine befindet sich im Anhang.

4.5.4 Interaktions-Muster von HDGF in Abhängigkeit verschiedener Phosphomutanten

Für HDGF konnten in Phosphoproteom-Studien bereits einige Phosphorylierungsstellen identifiziert werden. In einer Studie an humanen HT29 Zellen (Kolon-Adenokarzinomzellen) wurde beispielsweise Serin 165 als phosphoryliertes Peptid per Massenspektrometrie identifiziert ⁴⁵. Für Serin 103 konnten bereits funktionelle Daten erzeugt werden. Es wurde hier gezeigt, dass die Phosphorylierung an Serin 103 eine wichtige Rolle für die mitogene Aktivität von HDGF spielt ⁴⁸.

In einem initialen Versuch sollten daher die Auswirkungen verschiedener Phosphomutanten auf das Interaktions-Muster von HDGF untersucht werden. Dafür wurden die verschiedenen Mutanten als Strep-tag Fusionsproteine in HEK 293-Zellen exprimiert und über MacroPrep Z-Säulen aufgereinigt. Die Eluate wurden anschließend in einem Gradientengel (4-12 %) aufgetrennt und die Proteine mit kolloidalem Coomassie angefärbt. Wie in Abbildung 4-21 zu sehen ist, konnten deutliche Unterschiede im Bandenmuster der kogereinigten Proteine detektiert werden. Die Phosphomutanten S165A und S202A zeigten im Vergleich zum Wildtyp-HDGF eine deutliche Anreicherung von drei Proteinen die im Gradienten-Gel zwischen 25 und 15 kDa migrierten. Diese Proteine wurden mit Trypsin im Gel gespalten und die Peptide in der ESI-Ionenfalle analysiert. Die drei Banden konnten als Histon H2B Typ1C, Histon H2A Typ1B sowie Histon H4 identifiziert werden. Eine Liste der identifizierten Peptide befindet sich im Anhang (Punkt 8.1.3).

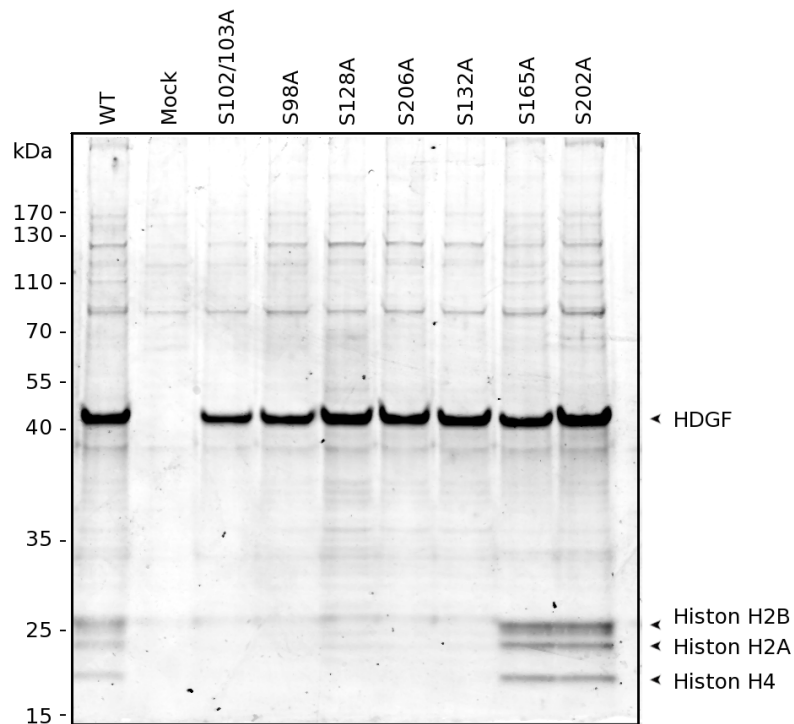


Abbildung 4-21: Analyse der Phosphomutanten von HDGF.

HEK 293-Zellen wurden mit HDGF (WT), einer Negativ-Kontrolle (Mock) sowie den verschiedenen Phosphomutanten von HDGF transfiziert und die Lysate anschließend über MacroPrep Z-Säulen aufgereinigt. Aufgetragen ist hier jeweils die Hälfte der Eluat-Fractionen von HDGF (WT), der Mock-transfizierten Kontrolle (Mock) sowie den verschiedenen Phosphomutanten von HDGF. Es ist zu sehen, dass bei einer annähernd gleichen Menge an aufgereinigtem HDGF bei den Phosphomutanten S165A und S202A eine Anreicherung von drei Proteinbanden im Vergleich zum WT vorlag. Die Banden dieser Proteine, die im SDS-Gel bei einer Größe zwischen 25 und 15 kDa migrierten, wurden ausgeschnitten und in der ESI-Ionenfalle analysiert. Es konnten Histon H2B Typ1C, Histon H2A Typ1B sowie Histon H4 identifiziert werden.

Bei den anderen Phosphomutanten zeigte sich dagegen im Vergleich zum WT-HDGF eine Abnahme dieser Proteine. Dieser Befund bestätigte die Ergebnisse aus 4.5.3 in Bezug auf die Identifizierung verschiedener Histone als Interaktionspartner von HDGF. Diese ersten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich bei der Interaktion von HDGF mit Histonen und anderen an diesem Komplex beteiligten Proteinen um einen regulierten Prozess handelt, der durch Phosphorylierung von HDGF mit gesteuert werden kann. Um diese initialen Ergebnisse zu bestätigen, müssen jedoch noch weitere Versuche durchgeführt werden.

5 Diskussion

5.1 HDGF-Proteinkomplexe

In Untersuchungen zu HDGF im Zusammenhang mit Tumoren konnte gezeigt werden, dass HDGF in vielen Tumoren eine erhöhte Expression aufweist und dies mit einer schlechten Prognose für den Patienten korreliert. Dies macht das Protein zu einem höchst interessanten Kandidaten für einen potentiellen prognostischen Marker. Ob, und wenn ja, über welche Wege HDGF an einer Tumorentstehung bzw. -entwicklung beteiligt oder in den Prozess der Metastasierung involviert sein könnte, gibt es bislang nur wenige weiterführende Untersuchungen. Um eine Idee zu erhalten, welche Funktion(en) HDGF in der Zelle innehat, sollten zunächst potentielle HDGF-interagierende Proteine identifiziert werden. Diese Fragestellung wurde bisher lediglich in einer Studie adressiert. Dort konnte mit Hilfe von Immunpräzipitationen und anschließender massenspektrometrischer Analyse eine Bindung von HDGF an die heterogenen Ribonukleoproteine (hnRNPs) K und I, sowie dem Onkoprotein TLS/Fus gezeigt werden. Funktionelle Daten zu diesen Interaktionen wurden in der Studie jedoch nicht vorgestellt³¹.

Zu Beginn der Arbeit sollte zunächst die Frage geklärt werden, ob HDGF in der Zelle in größeren Proteinkomplexen vorkommt. Diese Fragestellung wurde mit Hilfe zwei verschiedener Methoden angegangen. Sowohl bei der Untersuchung von HeLa- und HEK 293-Zelllysaten in der Größenausschlusschromatographie als auch in der nativen Gelelektrophorese konnte HDGF in einem Molekulargewichtsbereich von 400-700 kDa detektiert werden (Abbildung 4-1). Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass HDGF in hochmolekularen Komplexen in der Zelle vorliegt.

Für die Aufreinigung der HDGF-Proteinkomplexe wurde ein Fusionsprotein verwendet, welches aus der kodierenden Sequenz für das murine HDGF sowie einem Strep-tag am C-Terminus des Proteins bestand. Das Strep-tag-System

wurde verwendet, da es für die Aufreinigung von Proteinkomplexen zahlreiche Vorteile aufweist. Wie einleitend bereits erwähnt, handelt es sich beim Strep-tag um einen sehr kurzen Tag, der lediglich aus acht Aminosäuren besteht. Des Weiteren ist der Strep-tag biochemisch inert, zeigt eine große Resistenz gegenüber zellulären Proteasen, hat keinen Einfluss auf Proteinfaltung und –sekretion und kann unter milden Bedingungen eluiert werden, so dass die Aktivität von Proteinkomplexen weitestgehend erhalten bleibt⁶⁰. Seine hohe Spezifität zu Strep-Tactin, einem modifizierten Streptavidin, ermöglicht eine Aufreinigung mit nur geringem Hintergrund an unspezifisch bindenden Proteinen und eignet sich daher hervorragend für die Analyse von Proteinkomplexen¹². Mit dieser etablierten Methode konnten schon einige Proteinkomplexe gereinigt und ihre Komponenten identifiziert werden. Um auszuschließen, dass der verwendete Strep-tag die Bildung hochmolekularer HDGF-Komplexe verhindert, wurde auch das HDGF Strep-tag Fusionsprotein hinsichtlich seiner Verteilung in der Größenausschlusschromatographie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein ebenso wie das endogene Protein in der Lage ist, hochmolekulare Komplexe zu bilden. Dieses Ergebnis war die Voraussetzung, um HDGF-Proteinkomplexe über das Fusionsprotein aufzureinigen.

Für eine erfolgreiche Aufreinigung des HDGF Strep-tag Fusionsproteins wurden zunächst unterschiedliche Strep-Tactin gekoppelte Matrices auf ihre Eigenschaften hin untersucht. Dabei konnte für die Sepharose basierte Matrix neben der Anreicherung des Fusionsproteins auch eine starke Anreicherung unspezifisch bindender Proteine beobachtet werden. Trinkle-Mulcahy und Mitarbeiter konnten in einer Studie zeigen, dass sogenannte „Bead-Proteome“ also unspezifische Bindungen von Proteinen an die Matrix, die Analyse von Interaktionspartnern durch den hohen Hintergrund nicht-spezifischer Bindungen erschweren. Dieser Punkt traf insbesondere auch auf die Sepharose-Matrix zu⁶¹. Im weiteren Verlauf wurde daher eine Polymethacrylat (MacroPrep)-Matrix verwendet, die zu einer deutlichen Reduktion der unspezifischen Bindungen bei gleichzeitiger Anreicherung von HDGF Strep-tag führte. Die

Aufreinigung des Fusionsproteins konnte dahingehend optimiert werden, dass neben HDGF auch spezifisch weitere Proteine angereichert werden konnten. Dies gelang zum einen durch Verwendung der MacroPrep-Matrix, zum anderen aber auch durch Anpassen von Parametern wie der Konzentration der Ausgangsprobe oder der Anzahl an Waschschritten während der Aufreinigung. Die Konzentration der Probe sollte vor dem Säulenauftrag möglichst hoch sein, da die Spezifität der Bindung des Strep-tags an Strep-Tactin zwar sehr hoch ist, die Affinität der Bindung jedoch eher moderat ($K_d = 1 \mu\text{M}$). So kann es bei einer niedrig konzentrierten Probe zur Dissoziation des bereits gebundenen Strep-tags von der Matrix und damit zu einem Verlust an aufgereinigtem Fusionsprotein kommen^{13,60}. Für die HDGF-Aufreinigung erwies sich ein Volumen von 250 μl zur Lyse einer konfluenten 10 cm Zellkulturschale mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Gesamtprotein als optimal.

Zur Identifizierung von Interaktionspartnern wurden die HDGF-Eluate der Strep-tag Aufreinigung zunächst im SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine anschließend mit Coomassie-Färbung visualisiert. Im Vergleich zur Mock-Kontrolle (transfizierter Leervektor) konnten im HDGF-Eluat vier zusätzliche spezifische Proteinbanden identifiziert werden (Abbildung 4-6). Diese Proteine wurden im weiteren Verlauf der Arbeit mit Hilfe von Nano-LC ESI-MS Analysen identifiziert. Dabei wurden die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs), Ku86 und die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) sowie Nukleolin erfolgreich identifiziert. Um Bindungspartner zu detektieren, die in so geringen Mengen in den Eluat-Fractionen vorkamen, dass sie in der Coomassie-Färbung nicht sichtbar waren, wurden die Eluate der Aufreinigung auch direkt ohne vorherige Auftrennung im SDS-Gel mit Trypsin gespalten. Hier konnte Nukleolin ebenfalls als spezifischer Interaktionspartner nach HDGF detektiert werden. Weitere identifizierte Proteine waren Nukleophosmin, das heterogene Ribonukleoprotein A1 sowie das 40S ribosomale Protein S15 und das 60S ribosomale Protein L18. Die beiden durchgeführten Ansätze führten zur Identifizierung unterschiedlicher spezifischer Interaktionspartner für HDGF. Der Vorteil der tryptischen Spaltung

von Proteinen aus SDS-PAGE Gelen liegt in der Denaturierung der Proteine, wodurch die Spaltung der Proteine mit Trypsin erleichtert wird. Andererseits bietet eine direkte tryptische Spaltung der Proteine aus den Eluaten die Möglichkeit, auch solche Proteine zu identifizieren, die in der Coomassie-Färbung nicht sichtbar sind und daher auch nicht ausgeschnitten und analysiert werden. Es ist daher abschließend festzuhalten, dass es durchaus sinnvoll ist, beide Ansätze durchzuführen, um eine möglichst hohe Anzahl spezifischer Interaktionspartner zu identifizieren.

Um die Bedeutung der identifizierten Interaktionspartner für HDGF und mögliche biologische Zusammenhänge besser einschätzen zu können, sollen die identifizierten Proteine im Folgenden näher charakterisiert werden. Bei der DNA-PKcs handelt es sich um die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK), welche aus insgesamt drei Komponenten besteht. Neben der katalytischen Untereinheit gibt es eine weitere Komponente mit regulatorischer Funktion. Dabei handelt es sich um das Heterodimer Ku, welches aus dem identifizierten Ku86 sowie Ku70 besteht. Letzteres konnte in einem weiteren MS-Ansatz ebenfalls in den HDGF Strep-tag Eluaten nachgewiesen werden (Punkt 4.5.3). Funktionell ist dieser Komplex zusammen mit der DNA-Ligase IV, dem Kofaktor XRCC4 und der Nuklease Artemis die Hauptkomponente des Nicht-Homologen End-Joining (NHEJ), bei dem vorrangig Doppelstrangbrüche (DSB) repariert werden⁶². Erfolgt diese Reparatur nicht, kann es zu genomischer Instabilität kommen, was häufig ein Kennzeichen maligner Erkrankungen ist⁶³. Lepourcelet und Mitarbeiter konnten für HDGF eine korrelierende verstärkte Expression in Kolonkarzinomen zeigen, die eine fehlregulierte DNA-Reparatur aufwiesen³¹. Des Weiteren ist sowohl die DNA-PKcs als auch Ku durch Bindung an Enden von Chromosomen an der Stabilität von Telomeren beteiligt^{64,65}. PARP-1 synthetisiert Poly-(ADP-Ribose) und katalysiert die posttranslationale Modifizierung von Proteinen durch die Übertragung von ADP-Ribose aus NAD⁺ in Abhängigkeit von genotoxischem Stress. Dabei ist die katalytische Aktivität von PARP-1 abhängig von der Präsenz an Doppelstrangbrüchen. PARP-1 abhängige ADP-Ribosylierung spielt

eine Rolle bei der DNA-Reparatur, Rekombination, Zellproliferation, Transkription und bei der Aufrechterhaltung genomischer Stabilität⁶⁶. Es konnte gezeigt werden, dass PARP-1 Inhibitoren wie 3-Aminobenzamide (3-AB) zu einer erhöhten Inzidenz an Lebertumoren in Mäusen, die mit Diethylnitrosamin behandelt wurden, führte⁶⁷. Des Weiteren führte eine 3-AB-Behandlung zu vermehrten Hauttumoren bei UV-behandelten Mäusen⁶⁸. Die Tatsache, dass eine PARP-1-Aktivität zu einer verstärkten Tumorentstehung in Tieren beiträgt, konnte jedoch in den PARP-1 defizienten Mäusen zunächst nicht bestätigt werden⁶⁹. Hier zeigt sich eine Parallele zu HDGF defizienten Tieren, die bis heute keinen offensichtlichen Phänotyp zeigen³². Für Ku86, die DNA-PKcs sowie PARP-1 gibt es bereits Studien, die einen Zusammenhang dieser drei Proteine im DNA-Reparatur-Signalweg zeigen⁷⁰. Nukleolin konnte als einziges Protein in beiden Ansätzen, d.h. sowohl aus dem SDS-Gel als auch aus der tryptischen Spaltung der Eluate identifiziert werden. Nukleolin ist ein Phosphoprotein der Nukleoli, für das zahlreiche Funktionen in der Zelle beschrieben sind. Unter anderem ist bekannt, dass Nukleolin an der Ribosomen-Biogenese beteiligt ist⁷¹, verschiedene RNAs binden kann^{55,58,72,73} und in Zellproliferation und Apoptose involviert ist⁷⁴⁻⁷⁶. Des Weiteren ist Nukleolin in der Lage sich zwischen Nukleus, Zytoplasma und Zellmembran zu bewegen⁵⁴. Auf der Zelloberfläche fungiert Nukleolin als Rezeptor für Wachstumsfaktoren⁷⁷, Viren⁷⁸ und Lipoproteine⁷⁹. Eine Inhibition des Zelloberflächen-Nukleolin durch spezifische Peptide⁸⁰ oder Aptamere⁸¹ führt zu einem Rückgang der Angiogenese und Zellproliferation in Tumoren. Ein Aptamer (Aptamer AS1411), welches Nukleolin spezifisch auf der Zelloberfläche bindet, befindet sich derzeit in klinischen Studien⁸². In Studien konnte auch bereits ein Zusammenhang zwischen Nukleolin und PARP-1 gezeigt werden. Borggreve und Mitarbeiter konnten einen B-Zell spezifischen DNA Rekombinations-Komplex identifizieren, der sowohl Nukleolin als auch PARP-1 enthielt⁸³. Darüberhinaus konnten Yanagida und Mitarbeiter einen Nukleolin und PARP-1 enthaltenden Ribonukleoprotein-Komplex aus Nierenzellen isolieren⁸⁴. In diesem Komplex konnten auch Nukleophosmin und das heterogene Ribonukleoprotein A1 identifiziert werden, welche als

spezifische Interaktionspartner in der direkten Analyse der HDGF-Eluate gefunden wurden. Ebenfalls enthielt der Komplex die identifizierten ribosomalen Proteine. Nukleophosmin ist ebenfalls ein Phosphoprotein der Nukleoli und übernimmt -wie Nukleolin- Funktionen im Rahmen der Ribosomen-Biogenese. Des Weiteren kann sich Nukleophosmin, wie bereits für Nukleolin beschrieben, zwischen Nukleus, Zytoplasma und Zelloberfläche bewegen. Zusammen bilden Nukleophosmin und Nukleolin unter anderem einen Komplex mit K-Ras an der inneren Seite der Plasmamembran und tragen so zu K-RAS vermittelten Interaktionen im Rahmen des MAPK-Signalweges bei⁸⁵. Auch für HDGF konnte bereits eine Beteiligung am MAPK-Signalweg gezeigt werden. Mao und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine verstärkte Expression von HDGF in einer Magenkarzinom-Zelllinie zu einer spezifischen Aktivierung von Erk 1/2 im MAPK-Signalweg führte⁸⁶.

Die Koreinigung von bereits identifizierten Proteinkomplexen zeigte, dass die Aufreinigung spezifisch bindender Proteine in diesem Ansatz erfolgreich war. Die massenspektrometrische Identifizierung von Ku86 und Nukleolin konnte auch anhand spezifischer Antikörper im Western Blot bestätigt werden (Abbildung 4-7). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Rahmen dieser Arbeit neue bisher unbekannte Interaktionspartner von HDGF identifiziert werden konnten. Die Identifizierung aller Proteine erschien zunächst vielversprechend, da sie thematisch zu den für HDGF in der Literatur postulierten Daten passten. Aufgrund der Literaturlage zu Nukleolin und den äußerst zahlreichen Parallelen zu HDGF, sollte im weiteren Verlauf der Arbeit die Untersuchung zu HDGF und Nukleolin im Vordergrund stehen.

5.2 Untersuchungen zu HDGF und Nukleolin

Aufgrund der publizierten Daten für Nukleolin und HDGF waren zwei Ansätze für die Untersuchung der Interaktion von HDGF und Nukleolin als potentiell interessant anzusehen. Zum einen ist bekannt, dass HDGF als Wachstumsfaktor eine exogene proliferative Wirkung auf Zellen besitzt, die über

einen bisher unbekannten Rezeptor auf der Zelloberfläche vermittelt wird. Da Nukleolin als Rezeptor auf der Zelloberfläche für einige Wachstumsfaktoren wie z. B. Midkine publiziert ist, wäre die Untersuchung von Nukleolin als möglichem Oberflächenrezeptor für HDGF eine interessante Hypothese für weitere Untersuchungen gewesen. Des Weiteren ist ebenfalls eine Interaktion von HDGF und Nukleolin in der Zelle denkbar. Beide Proteine werden überwiegend im Zellkern exprimiert und haben Einfluss auf Vorgänge in der Zelle wie Proliferation und Apoptose. Daher ist die Untersuchung der Funktion eines HDGF-Nukleolin Proteinkomplexes in der Zelle ebenfalls äußerst interessant. Da der Ansatz der Arbeit die Identifizierung von Interaktionspartnern von HDGF in der Zelle darstellte und die Aufreinigungsstrategie ebenfalls für intrazelluläre Proteine optimiert wurde, sollte zunächst untersucht werden, ob es mögliche Bereiche in der Zelle gibt, die für eine Interaktion von HDGF und Nukleolin in Frage kommen. Daher sollten immunzytochemische Untersuchungen hinsichtlich der Lokalisation der beiden Proteine in der Zelle durchgeführt werden. Wie einleitend bereits erwähnt, wird HDGF aufgrund seiner zwei nukleären Lokalisationssignale in den meisten Zelltypen überwiegend im Nukleus exprimiert. Nukleolin ist hauptsächlich in den Nukleoli lokalisiert, kann aber zwischen Nukleus und Zytoplasma wechseln und wird auch an der Zelloberfläche exprimiert. Eine Untersuchung der endogenen Proteine in HeLa-Zellen zeigte, dass die Nukleolin-Lokalisation überwiegend auf die Nukleoli beschränkt war, es aber auch Bereiche im Nukleus gab, in denen sich sowohl HDGF als auch Nukleolin befinden. Überraschenderweise zeigte ein geringer Anteil Zellen eine zytoplasmatische Lokalisation sowohl für HDGF als auch Nukleolin (Abbildung 4-8). Die Transfektion einer cDNA, die für murines HDGF kodierte, zeigte ein vergleichbares Ergebnis (Abbildung 4-9). Um die zytoplasmatische Lokalisation der beiden Proteine genauer zu untersuchen, erfolgte die Transfektion einer cDNA, die für eine NLS 2-Mutante von HDGF kodierte. Die NLS 2-Mutante führt aufgrund einer Mutation im zweiten nukleären Lokalisationssignal (NLS 2) zu einer überwiegend zytoplasmatischen Lokalisation von HDGF. Sollte die Verteilung von Nukleolin und HDGF einander bedingen, sollte sich die subzelluläre Lokalisation von Nukleolin in Abhängigkeit

zur HDGF-Lokalisation verhalten. Tatsächlich korrelierte die zytoplasmatische HDGF Lokalisation mit der Lokalisation von endogenem Nukleolin (Abbildung 4-10). Für Nukleolin konnte im Gegensatz zu HDGF in Studien bereits gezeigt werden, dass es in der Lage ist, die subzelluläre Verteilung von Proteinen zu beeinflussen. So bindet Nukleolin an Stat1 und führt zur Translokation des Proteins aus dem Zellkern. Dieser Mechanismus spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen⁸⁷. Wie Dambara und Mitarbeiter zeigen konnten, ist eine Bindung von Nukleolin an das Protein GZF1 eine Voraussetzung für die nukleäre Lokalisation des Proteins und seine Funktion als Transkriptionsrepressor⁸⁸. Auch für HDGF konnte bereits eine reprimierende Wirkung auf die Transkription gezeigt werden. Dabei bindet HDGF das C-terminale Bindeprotein (CtBP) und führt darüber zu einer Repression der Transkription des SMYD1-Gens²¹. Die Behandlung von Prostatakarzinomzellen mit einem Nukleolin-spezifischen Aptamer führte zur Translokation eines Komplexes bestehend aus Nukleolin und seinem Bindungspartner PRMT5 (Protein Arginin Methyltransferase 5) aus dem Nukleus ins Zytoplasma. Durch diese Umverteilung kommt es zur Aufhebung der Funktion von PRMT5 als Transkriptionsrepressor für seine Zielgene, wie z.B. Cyclin E2⁸¹. Die Ergebnisse zur Lokalisation von HDGF und Nukleolin zeigten, dass es sowohl Bereiche im Zellkern als auch im Zytoplasma der Zelle gibt, in denen beide Proteine exprimiert werden und eine Komplexbildung möglich wäre. Darüberhinaus scheint HDGF, wenn auch unter artifiziellen Bedingungen, in der Lage zu sein, die subzelluläre Lokalisation von Proteinen, in diesem Fall von Nukleolin zu beeinflussen. Ob diese Beobachtung eine biologisch relevante Funktion besitzt, wurde in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt und muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Es ist abschließend festzustellen, dass dieses Ergebnis die Resultate aus Massenspektrometrie und Western Blot hinsichtlich einer spezifischen Interaktion der beiden Proteine bestärkt. Aufgrund der Ergebnisse aus der Immunzytochemie wäre zu erwarten gewesen, dass eine verstärkte zytoplasmatische Lokalisation von HDGF und Nukleolin zu einer erhöhten Menge des gebildeten Komplexes führt. Es zeigte sich jedoch, dass eine verstärkte zytoplasmatische Lokalisation der Proteine

aufgrund der Expression der NLS 2-Mutante von HDGF keinen Einfluss auf die Menge des kogereinigten Nukleolins hatte. Nicht auszuschließen ist auch, dass ein anderer Faktor, wie z.B. die Bcl-2 mRNA in diesem Fall limitierend ist und die Bildung des Komplexes daher nicht gesteigert werden kann. Dies spricht dafür, dass eine Komplexbildung schon im Zellkern stattfindet.

Während der Aufreinigung der HDGF-Proteinkomplexe fiel auf, dass je schneller und schonender die Aufreinigung durchgeführt wurde, desto besser die Ausbeute koreinigender Proteine im HDGF-Eluat war. Diese Beobachtung zusammen mit der Literaturlage zu Nukleolin führte zu der Arbeitshypothese, dass HDGF-Interaktionen auch RNA-assoziiert sein könnten. Nukleolin besitzt vier RNA-Bindedomänen⁸⁹ und ist in der Literatur als RNA-bindendes Protein beschrieben. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Interaktionen von Nukleolin über eine RNA-Bindung vermittelt werden. So konnten Yanagida und Mitarbeiter zeigen, dass die Bindung von Nukleolin und einem Ribonukleoproteinkomplex im Nukleolus spezifisch über eine RNA-Bindedomäne von Nukleolin vermittelt wird⁸⁴. Darüberhinaus konnten Padilla und Mitarbeiter nachweisen, dass eine Interaktion von Nukleolin mit dem Protein BIG1 im Nukleus durch Inkubation mit RNase A vor der Aufreinigung verhindert werden konnte⁵⁶. Sollte die Interaktion von HDGF und Nukleolin über RNA vermittelt werden, würde eine Inkubation der Lysate mit RNase A vor der Aufreinigung die Koreinigung des Bindungspartners verhindern. Diese Hypothese konnte experimentell für die Interaktion von HDGF und Nukleolin im Western Blot bestätigt werden (Abbildung 4-13). Eine Koreinigung von Nukleolin wurde durch die Behandlung der Lysate mit RNase A vollständig verhindert. Der Versuch zeigte deutlich, dass die Interaktion von HDGF und Nukleolin ebenfalls über RNA vermittelt wird. Da für Nukleolin eine Abhängigkeit seiner Protein-Interaktionen von RNA bereits gezeigt werden konnte, überraschte das Ergebnis im Hinblick auf Nukleolin nicht. Für HDGF liegen jedoch bis heute keine Daten zu Interaktionen mit RNA vor. Lediglich die Studie von Lepourcelet und Mitarbeitern postulierte nach Identifizierung von heterogenen Ribonukleoproteinen als Bindungspartner von HDGF eine

Beteiligung von HDGF in der RNA-Prozessierung³¹. Deswegen ist das Ergebnis im Hinblick auf mögliche Funktionen von HDGF sehr interessant, da hier zum ersten Mal gezeigt werden konnte, dass es einen funktionellen Zusammenhang zwischen HDGF und einer möglichen RNA-Bindung gibt.

5.3 Untersuchungen zu HDGF und Nukleolin in Abhängigkeit von Bcl-2

Aufgrund der Ergebnisse zur RNA-Abhängigkeit der Interaktion von HDGF und Nukleolin stellte sich im weiteren Verlauf der Arbeit die Frage, welche RNA für die Vermittlung der Interaktion der beiden Proteine verantwortlich ist. Beim Vergleich der Literatur für beide Proteine erschien vor allem eine RNA besonders interessant. Für Nukleolin konnte bereits in mehreren Studien eine Bindung an die 3'Untranslatierte Region (3'UTR) der Bcl-2 mRNA beschrieben werden⁵⁷⁻⁵⁹. Neben der gut untersuchten Interaktion von Nukleolin und der Bcl-2 mRNA gibt es auch in der HDGF-Literatur eine Verbindung zu Bcl-2. Liao und Mitarbeiter konnten einen Einfluss des HDGF-Proteinspiegels auf verschiedene Mitglieder der Bcl-2-Familie, insbesondere auch auf Bcl-2 zeigen. Eine verringerte HDGF-Expression (siRNA-Ansatz) führte dort zu einem erniedrigten Proteinspiegel von Bcl-2⁹⁰. Bcl-2 (B-Zell Lymphoma 2) ist das namensgebende Mitglied einer Familie von Proteinen, die eine wichtige Rolle im Rahmen des programmierten Zelltods, der Apoptose spielen. Die Proteinfamilie spaltet sich dabei in pro- und anti-apoptotisch wirksame Mitglieder auf. Bcl-2 ist dabei ein Protein mit anti-apoptotischer Wirkung und wurde zunächst in Zusammenhang mit der Entwicklung von B-Zell Lymphomen identifiziert. Bcl-2 vermittelt seine Wirkung im Zusammenhang der Apoptose über den mitochondrialen Signalweg⁹¹. Es konnte gezeigt werden, dass Nukleolin an ein Adenosin und Uracil-reiches Element (ARE) von 136 bp in der 3'UTR von Bcl-2 bindet und zusammen mit anderen Faktoren wie AUF1 für die Stabilisierung der Bcl-2 mRNA sorgt^{58,59}. Um einen Zusammenhang zwischen der Bcl-2 mRNA und dem Proteinkomplex aus Nukleolin und HDGF zu

untersuchen, sollte der direkte Einfluss einer HDGF-Überexpression auf Bcl-2 untersucht werden. Um dies zu überprüfen, wurde HDGF in HeLa-Zellen überexprimiert und die Auswirkungen zunächst auf Ebene der Bcl-2 mRNA untersucht. Da das zelluläre Kompartiment der Bildung des Protein-RNA Komplexes unbekannt ist und sowohl der Zellkern als auch das Zytoplasma als Ort denkbar wären, wurde sowohl Wildtyp-HDGF (Expression überwiegend im Nukleus), als auch eine NLS 2-Mutante von HDGF (Expression überwiegend im Zytoplasma) für die weiteren Untersuchungen verwendet. Tatsächlich führte eine Überexpression von Wildtyp-HDGF und der NLS 2-Mutante zu keiner signifikant erhöhten Menge an Bcl-2 mRNA im Vergleich zu einer Kontrolle. Eine Erhöhung der Proteinmenge von Bcl-2 ließ sich bei beiden HDGF-Varianten ebenfalls nicht nachweisen (Abbildung 4-15). Diese Daten korrelierten mit neuesten Ergebnissen zu Nukleolin, für das gezeigt werden konnte, dass es neben dem Einfluss auf die Stabilität von mRNAs, vor allem durch eine erhöhte Anzahl an Polysomen zu einer verstärkten Translation spezifischer mRNAs beiträgt⁹². Ob die Bcl-2 mRNA tatsächlich als vermittelnde RNA für die Interaktion von HDGF und Nukleolin fungiert, sollte durch eine Behandlung von HEK 293-Zellen mit Paclitaxel gezeigt werden. In Studien konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Paclitaxel, einem Zytostatikum, welches zur Stabilisierung von Mikrotubuli und damit zum Zelltod führt, die Bcl-2 mRNA destabilisiert und damit die Bindung von Proteinen wie Nukleolin auf der 3'UTR der mRNA nicht mehr effizient ist⁵⁷. Sollte also die Bcl-2 mRNA einen vermittelnden Effekt auf den Proteinkomplex ausüben, wäre eine verminderte Koreinigung von Nukleolin mit dem HDGF Strep-tag Protein zu erwarten. Tatsächlich konnte eine Reduktion der Koreinigung von Nukleolin gezeigt werden (Abbildung 4-14). Dieses Ergebnis führte zu einer weiteren Bestätigung der Hypothese, dass es sich um einen Protein-RNA Komplex handelt. Des Weiteren lieferte das Ergebnis einen ersten Hinweis darauf, dass es sich bei der Bcl-2 mRNA tatsächlich um eine beteiligte RNA dieses Komplexes handelt.

Eine interessante Fragestellung war nun, ob eine Erhöhung der Menge von

Bcl-2 auf mRNA oder Proteinebene eine Komplexbildung induzieren kann. Wenn man die Bcl-2 mRNA als wichtige Komponente des HDGF-Nukleolin Proteinkomplexes postuliert, würde man erwarten, dass es durch ein erhöhtes Angebot der mRNA in der Zelle zu einer verstärkten Komplexbildung kommt. Dafür wurde die Menge der Vollängen mRNA von Bcl-2, im Folgenden als VL bezeichnet, in HeLa-Zellen durch Transfektion erhöht. Tatsächlich konnte in diesen Proben eine verstärkte Koreinigung von Nukleolin mit HDGF Strep-tag im Vergleich zu einer Kontrolle (transfizierter Leervektor) beobachtet werden. Es wurde nun im weiteren Verlauf der Arbeit untersucht, ob dieser Effekt durch die mRNA oder im Zusammenhang mit dem gebildeten Bcl-2 Protein vermittelt wird. Dafür wurden verschiedene Deletionskonstrukte der Bcl-2 mRNA erzeugt und die Koreinigung von Nukleolin und HDGF bei einer vergleichbaren Menge an exprimiertem Bcl-2 Protein untersucht. Als erstes überraschendes Ergebnis konnte festgestellt werden, dass die kodierende Sequenz von Bcl-2 (cds) eine Koreinigung von Nukleolin vollständig verhinderte. Das Anhängen der 5'UTR bzw. der 3'UTR an die cds von Bcl-2 konnte diesen Effekt jedoch wieder aufheben. Schon der Anhang des ARE1-Elementes der 3'UTR, welches als Bindungsmotif für Nukleolin auf der Bcl-2 mRNA identifiziert werden konnte, reichte aus, um die Koreinigung von Nukleolin zu ermöglichen (Abbildung 4-18). Dieses Ergebnis deutete zunächst darauf hin, dass die mRNA alleine z.B. durch Bindung von Nukleolin an die 3'UTR zur Bildung des Komplexes beiträgt. Überraschend war daher, dass der Effekt einer Koreinigung auch mit der 5'UTR auftrat. In einer aktuellen Studie konnten Abdelmohsen und Mitarbeiter jedoch eine Bindung von Nukleolin an die 5'UTR neben der bereits bekannten Bindung an die 3'UTR der Bcl-2 mRNA zeigen⁹². Diese Untersuchungen bestätigten damit das Ergebnis dieser Arbeit und führten zu der Hypothese, dass Nukleolin sowohl auf der 5' als auch auf der 3'UTR der Bcl-2 mRNA bindet und dass über diese Bindung eine Interaktion von HDGF und Nukleolin vermittelt werden kann. Falls nur die 5' und 3'UTR an der Interaktion von HDGF und Nukleolin beteiligt sind, würde man erwarten, dass der Austausch der kodierenden Sequenz von Bcl-2 gegen die kodierende Sequenz eines anderen Proteins den gleichen Effekt wie das Vollängen-

Konstrukt von Bcl-2 bewirkt. Das würde bedeuten, dass die Koreinigung von Nukleolin im Vergleich zur Kontrolle erhöht sein sollte. Überraschenderweise konnten die Untersuchungen diese Hypothese nicht bestätigen. Der Austausch der kodierenden Sequenz von Bcl-2 gegen die kodierende Sequenz von SEAP (Sekretierte alkalische Phosphatase) konnte die Koreinigung von Nukleolin nicht steigern (Abbildung 4-19). Das Ergebnis deutet also darauf hin, dass neben der Bindung von Nukleolin an die 5' und 3'UTR, eine Bindung von HDGF an die cds von Bcl-2 notwendig ist, damit es zur effizienten Bildung des Protein-RNA Komplexes kommen kann. Um diese Hypothese zu verifizieren, müssen jedoch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, die eine direkte Bindung von HDGF an die cds von Bcl-2 zeigen. Dies könnte durch Inkubation von biotinylierter RNA (Bcl-2 cds) mit Zelllysats sowie mit rekombinantem HDGF-Protein und anschließender Aufreinigung mit Strep-Tactin Beads nachgewiesen werden.

Wie bereits diskutiert, zeigte sich ein konträrer Zusammenhang von Bcl-2 Volllänge (VL) und der kodierenden Sequenz (cds) in Bezug auf die Koreinigung von Nukleolin. Daraus resultierte die Vorstellung, dass die Zusammensetzung der Komplexe in Abhängigkeit von den beiden Konstrukten unterschiedlich sein muss. Um dies näher zu untersuchen, wurden drei biologische Replikate von Eluat der zwei Konstrukte (VL und cds) mit Hilfe eines LTQ-Orbitrap Massenspektrometers untersucht. Diese Daten wurden anschließend mit der MaxQuant-Software in Zusammenarbeit mit Dr. Sebastian Franken ausgewertet. Ziel dieser Untersuchung war es, das Muster an Interaktionspartnern der zwei Proben miteinander zu vergleichen. Die Darstellung der statistischen Auswertung erfolgte mit einem sogenannten Volcano-Plot, bei dem die statistisch signifikant angereicherten Proteine einer Probe, in diesem Fall der VL-Probe dargestellt sind (Abbildung 4-20). Wie zu erwarten, konnte Nukleolin als ein stark angereichertes Protein in dieser Probe identifiziert werden. Darüberhinaus fiel auf, dass ribosomale Proteine sowie Histone in der VL-Probe stark angereichert waren. Die Identifizierung ribosomaler Proteine war im Zusammenhang mit Nukleolin nicht überraschend,

da Nukleolin an der Biogenese und Reifung von Ribosomen beteiligt ist⁷¹. Wie bereits erwähnt, konnten Yanagida und Mitarbeiter einen Nukleolin-bindenden Ribonukleoproteinkomplex isolieren, der neben 40 ribosomalen auch 20 nicht-ribosomale Proteine enthielt. Hier konnten unter anderem auch Ku86 und PARP-1 identifiziert werden⁸⁴. Aufgrund dieser Ergebnisse wäre es denkbar, dass HDGF und Nukleolin Teil eines Multiproteinkomplexes sind, der Ribosomen-assoziiert ist. Hinweise, dass HDGF einen Einfluss auf die Translation ausübt, gibt es bislang jedoch nicht.

Nukleolin bildet ebenfalls das Bindeglied für die interessante Identifikation von verschiedenen Histonen in der VL-Probe. Dies lässt sich mit der Rolle von Nukleolin im Rahmen der Transkription erklären. Studien postulieren eine Funktion von Nukleolin im Bereich der Transkription als Histon-Chaperon und Modellierer von Chromatin^{93,94}. Histon-Chaperone sind verantwortlich für die dynamische Organisation von Chromatin-Matrizen, für die Translokation von Histonen in den Nukleus und sorgen für den Austausch und die Platzierung von Histonen auf dem DNA-Strang während der Replikations-abhängigen Chromatin-Bildung. Da 80 % des Genoms in Form von Chromatin vorliegt, muss es Faktoren geben, die eine Transkription trotz sterischer Barrieren in Form der Nukleosomen ermöglichen. Nukleolin bindet dabei direkt an Histon H2A-H2B-Dimere und erleichtert durch Einlagerung der Dimere in Tetrasomen die Bildung von Nukleosomen. Interessanterweise war Histon H2A eines der spezifisch angereicherten Proteine in der Analyse der HDGF-VL-Eluat in der LTQ-Orbitrap. Durch den dynamischen Effekt von Nukleolin auf den Ein- und Ausbau der H2A-H2B Dimere wird die Passage für die RNA-Polymerase durch die Nukleosomen und damit die Transkription erleichtert. Dieser Vorgang wurde eingehend am Protein FACT (Facilitates Chromatin transcription) untersucht⁹⁵. Nukleolin werden daher FACT-ähnliche Eigenschaften zugesprochen⁹⁴. Darüberhinaus ist auch eine Chromatin-Assoziation von HDGF bekannt. Die Sumoylierung von HDGF an Lysin 80 führt zu einem Verlust der Bindung von HDGF an Chromatin und scheint damit reguliert zu sein⁴⁹. Eine Rolle für HDGF in der transkriptionellen Regulation wurde in einer Studie von Everett und

Mitarbeitern nachgewiesen. Die repressorische Wirkung auf die Transkription des SMYD1-Gens erfolgte dabei über die Bindung von HDGF an einen transkriptionellen Korepressor, das C-terminale Bindeprotein (CtBP)²¹.

Erste Hinweise auf eine Regulation der HDGF-Histon Interaktion ergaben sich aus Experimenten mit Phosphorylierungsmutanten von HDGF. Wie einleitend bereits erwähnt, wird HDGF phosphoryliert und für eine Phosphorylierung an Serin 103 konnten bereits funktionelle Daten gezeigt werden⁴⁸. Daher wurde der Einfluss verschiedener Phosphomutanten auf das Interaktionsmuster von HDGF untersucht. Tatsächlich konnte bei der Analyse der Phosphomutanten im Coomassie gefärbten SDS-Gel eine Anreicherung von Histonen festgestellt werden. Histon H2B Typ 1C, Histon H2A TypB sowie Histon H4 waren bei den Phosphomutanten von Serin 165 und Serin 202 im Vergleich zum Wildtyp HDGF stark angereichert (Abbildung 4-21). Dieses Ergebnis deutet auf eine regulatorische Komponente der Bindung von HDGF und Histonen über den Phosphorylierungsstatus von HDGF hin.

5.4 Bedeutung der identifizierten Interaktionspartner im Hinblick auf mögliche Funktionen von HDGF

Abschließend sollen die Bedeutung der identifizierten Interaktionspartner im Hinblick auf potentielle Funktionen von HDGF noch einmal zusammenfassend dargestellt werden. Dabei soll die Rolle von HDGF in Proteinkomplexen diskutiert und mögliche Modelle postuliert werden.

Die Interaktion von HDGF mit identifizierten Proteinen aus dem DNA-Reparatur Signalweg (Ku86, DNA-PKcs und PARP-1) könnte auf eine mögliche Funktion von HDGF im Rahmen der DNA-Reparatur hinweisen. Da eine funktionierende DNA-Reparatur-Mechanik essentiell für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität ist, liegen in Tumoren häufig Störungen dieser Reparaturmechanismen vor. Werden Schäden der DNA wie z.B. Doppelstrangbrüche nicht mehr adäquat repariert, ist die Entwicklung von

Tumoren begünstigt⁶³. Da HDGF eine Rolle in der Tumorentstehung bzw.-entwicklung zugesprochen wird, wäre eine Beteiligung HDGF-enhaltender Proteinkomplexe an DNA-Reparatur-Mechanismen denkbar. Eine Beteiligung von HDGF-Proteinkomplexen in Mechanismen der DNA-Reparatur erscheint sehr interessant und sollte in weitergehenden Untersuchungen näher analysiert werden.

Die in dieser Arbeit begonnene Charakterisierung der Interaktion von HDGF und Nukleolin führte zum postulierten Modell eines HDGF-Nukleolin-RNA Komplexes. Es konnte gezeigt werden, dass HDGF und Nukleolin über RNA miteinander interagieren. Als eine beteiligte RNA konnte dabei die Bcl-2 mRNA identifiziert werden. Aus Studien ist bereits bekannt, dass Nukleolin sowohl an die 5' als auch an die 3'UTR der Bcl-2 mRNA binden kann. Da aber die Interaktion von Nukleolin mit der UTR der Bcl-2 mRNA alleine nicht ausreichte, um eine effiziente Koreinigung von HDGF und Nukleolin zu bewirken und eine Expression der Bcl-2 cds alleine die Interaktion von Nukleolin und HDGF verhinderte, muss die logische Schlussfolgerung sein, dass HDGF auf der kodierenden Sequenz (cds) der Bcl-2 mRNA bindet. Für eine effiziente Interaktion von Nukleolin und HDGF muss demnach eine Bindung von Nukleolin auf der 5' oder 3' UTR sowie von HDGF auf der cds der Bcl-2 mRNA erfolgen. Dafür muss in weiteren Untersuchungen die direkte Bindung von HDGF an die cds von Bcl-2 gezeigt werden. Da es sich bei Bcl-2 um ein Schlüsselprotein des intrinsischen apoptotischen Signalweges handelt und sowohl für Nukleolin als auch für HDGF eine Beteiligung bei apoptotischen Vorgängen gezeigt werden konnte, erscheint der identifizierte Nukleolin-HDGF-Bcl-2 mRNA-Komplex äußerst interessant im Hinblick auf Vorgänge, die im Rahmen der Apoptose stattfinden. Weitere Untersuchungen sollen daher zeigen, ob dieser Komplex einen Einfluss auf den programmierten Zelltod ausübt.

Die transkriptionelle Regulation von Bcl-2 wurde in vielen wissenschaftlichen Ansätzen gut untersucht. Für HDGF konnte bereits ein regulatorischer Einfluss auf Transkriptionsebene für das SMYD1-Gen über Bindung an das c-terminale

Bindeprotein gezeigt werden²¹. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die beobachtete Erniedrigung der Bcl-2 mRNA nach Gabe von inhibitorischen RNAs gegen HDGF auf einen transkriptionellen Kontrollmechanismus zurückzuführen ist. Neben der transkriptionellen Kontrolle wurde in verschiedenen Studien der post-transkriptionellen Regulation der Bcl-2 mRNA eine wichtige Rolle zugewiesen, bei der auch Nukleolin und seine Interaktionen mit den 5' und 3'UTRs eine zentrale Rolle spielt. Die hier erhobenen Daten lassen daher den Schluss zu, dass HDGF über eine Beteiligung an einem Nukleolin enthaltenden Ribonukleoproteinkomplex regulatorische Funktionen für Bcl-2 auf post-transkriptioneller Ebene übernimmt.

Aufgrund der ermittelten Daten ist es ebenfalls denkbar, dass es sich um einen HDGF-Nukleolin-RNA Komplex handelt, der neben der Bcl-2 mRNA noch weitere RNAs enthält. Auf Grundlage dieses postulierten Protein-RNA Modells sowie der Identifikation ribosomaler Proteine und Histone wäre eine Beteiligung des Komplexes sowohl an Transkriptions- als auch Translationsvorgängen denkbar. Aufgrund der Funktion von Nukleolin, die Anzahl an Polysomen und darüber die Translation spezifischer mRNAs zu steigern, wäre ein HDGF-Nukleolin-Komplex vorstellbar, der für die Translation spezifischer mRNAs wie z.B. Bcl-2 verantwortlich ist⁹².

Da eine Komplexbildung höchstwahrscheinlich im Zellkern stattfindet, könnte es sich auch um einen Komplex handeln, der für den Transport spezifischer RNAs aus dem Kern ins Zytoplasma verantwortlich ist.

Abschließend lässt sich festhalten, dass es im Rahmen dieser Arbeit gelungen ist einen HDGF-Nukleolin-RNA Komplex zu isolieren, dessen genaue Funktion nun in weiteren Untersuchungen geklärt werden muss. Als Grundlage für weitere Analysen dient der in dieser Arbeit analysierte Mechanismus, über den die Interaktion von HDGF und Nukleolin über die Bcl-2 mRNA vermittelt wird.

Kürzlich konnte eine Arbeitsgruppe in einer Interaktom-Analyse von HDGF ebenfalls die in dieser Arbeit identifizierten Proteine PARP-1, DNA-PKcs, Nukleolin sowie Histone und ribosomale Proteine identifizieren⁹⁶. Damit wurden die Ergebnisse dieser Arbeit hinsichtlich der Identifizierung der

Interaktionspartner von HDGF bestätigt. Funktionelle Daten wurden in der Publikation von Zhao und Mitarbeitern im Gegensatz zu dieser Arbeit jedoch nicht vorgestellt.

6 Zusammenfassung

Der Hepatoma-derived growth factor (HDGF) wird in vielen Tumoren verstärkt exprimiert. Die Höhe der Expression korreliert dabei in einigen Tumorarten, wie z.B. dem hepatozellulären Karzinom, mit einer schlechten Prognose für die Patienten. Daher wird HDGF in der Literatur als vielversprechender prognostischer Marker für diese Tumore eingeschätzt. Ob HDGF jedoch darüber hinaus auch eine Funktion in der Entstehung und dem Verlauf von Tumorerkrankungen zukommt, konnte bislang nicht ausreichend geklärt werden. Dies liegt unter anderem an dem fehlenden Verständnis der zellbiologischen Funktionen von HDGF. Das Ziel der vorgelegten Arbeit war daher die Identifizierung spezifischer Interaktionspartner und die Charakterisierung möglicher zellbiologischer Funktionen dieser Interaktionen.

HDGF-enhaltende Proteinkomplexe wurden zunächst über das Strep-tag/Strep-Tactin System angereichert. Kogereinigte Proteine wurden zur Identifizierung tryptisch gespalten und massenspektrometrisch analysiert. Über diesen Ansatz konnten Nukleolin, Ku86, PARP-1, die katalytische Untereinheit der DNA-PK sowie ribosomale Proteine und Histone als spezifische Interaktionspartner identifiziert werden. Im weiteren Verlauf wurde die Interaktion von HDGF und Nukleolin näher charakterisiert. Die Koreinigung von Nukleolin über das HDGF-Strep-tag/Strep-Tactin-System erwies sich dabei als abhängig von RNA. Da in vorhergehenden Studien bereits eine posttranskriptionelle Regulation der Expressionshöhe von Bcl-2, einem bekannten Onkogen, beschrieben wurde und auch für HDGF eine Wirkung auf die zelluläre Bcl-2 Menge nachgewiesen werden konnte, konzentrierten sich die weiteren Studien auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Bcl-2 und dem neu identifizierten HDGF-Nukleolin-Komplex. Durch Expressionsstudien in einer Tumorzelllinie konnte im Folgenden nachgewiesen werden, dass eine Erhöhung der intrazellulären mRNA von Bcl-2 die Koreinigung von Nukleolin zusammen mit HDGF Strep-tag verstärkt. Experimente mit

Deletionskonstrukten dieser mRNA wiesen überraschenderweise nach, dass neben den untranslatierten Regionen, die auf Grund von früheren Studien schon bekannt für ihre regulatorische Funktion waren, auch die kodierende Region der Bcl-2 mRNA essentiell für eine effiziente Induktion der HDGF-Nukleolin-Komplexbildung ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse weisen daher auf eine mögliche Funktion von HDGF in der posttranskriptionellen Expressionskontrolle von Bcl-2 innerhalb eines Nukleolin-enthaltenden Ribonukleoproteinkomplexes hin und zeigen so einen neuen Ansatz auf, eine mögliche Beteiligung von HDGF an Prozessen während der Entstehung und dem Verlauf von Tumoren zu erklären.

7 Literatur

1. Gstaiger M, Aebersold R. Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. *Nat. Rev. Genet.* 2009;10(9):617-627.
2. Schnable PS, Ware D, Fulton RS, et al. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science.* 2009;326(5956):1112-1115.
3. Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, et al. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science.* 2000;287(5461):2204-2215.
4. Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS. A vision for the future of genomics research. *Nature.* 2003;422(6934):835-847.
5. Stumpf MPH, Thorne T, de Silva E, et al. Estimating the size of the human interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105(19):6959-6964.
6. Wahl MC, Will CL, Lührmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell.* 2009;136(4):701-718.
7. Schmeing TM, Ramakrishnan V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature.* 2009;461(7268):1234-1242.
8. Alber F, Dokudovskaya S, Veenhoff LM, et al. The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature.* 2007;450(7170):695-701.
9. Phizicky EM, Fields S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.* 1995;59(1):94-123.
10. Bauer A, Kuster B. Affinity purification-mass spectrometry. Powerful tools for the characterization of protein complexes. *Eur. J. Biochem.* 2003;270(4):570-578.
11. Lichty JJ, Malecki JL, Agnew HD, Michelson-Horowitz DJ, Tan S. Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr. Purif.* 2005;41(1):98-105.

12. Skerra A, Schmidt TG. Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Meth. Enzymol.* 2000;326:271-304.
13. Voss S, Skerra A. Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* 1997;10(8):975-982.
14. Junttila MR, Saarinen S, Schmidt T, Kast J, Westermarck J. Single-step Strep-tag purification for the isolation and identification of protein complexes from mammalian cells. *Proteomics.* 2005;5(5):1199-1203.
15. Hafrén A, Hofius D, Rönnholm G, Sonnewald U, Mäkinen K. HSP70 and its cochaperone CIP1 promote potyvirus infection in *Nicotiana benthamiana* by regulating viral coat protein functions. *Plant Cell.* 2010;22(2):523-535.
16. Nakamura H, Kambe H, Egawa T, et al. Partial purification and characterization of human hepatoma-derived growth factor. *Clin. Chim. Acta.* 1989;183(3):273-284.
17. Oliver JA, Al-Awqati Q. An endothelial growth factor involved in rat renal development. *J. Clin. Invest.* 1998;102(6):1208-1219.
18. Nakamura H, Izumoto Y, Kambe H, et al. Molecular cloning of complementary DNA for a novel human hepatoma-derived growth factor. Its homology with high mobility group-1 protein. *J. Biol. Chem.* 1994;269(40):25143-25149.
19. Everett AD, Stoops T, McNamara CA. Nuclear targeting is required for hepatoma-derived growth factor-stimulated mitogenesis in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 2001;276(40):37564-37568.
20. Yang J, Everett AD. Hepatoma-derived growth factor binds DNA through the N-terminal PWWP domain. *BMC Mol. Biol.* 2007;8:101.
21. Yang J, Everett AD. Hepatoma-derived growth factor represses SET and MYND domain containing 1 gene expression through interaction with C-terminal binding protein. *J. Mol. Biol.* 2009;386(4):938-950.
22. Abouzied MM, Baader SL, Dietz F, et al. Expression patterns and different

subcellular localization of the growth factors HDGF (hepatoma-derived growth factor) and HRP-3 (HDGF-related protein-3) suggest functions in addition to their mitogenic activity. *Biochem. J.* 2004;378(Pt 1):169-176.

23. Dietz F, Franken S, Yoshida K, et al. The family of hepatoma-derived growth factor proteins: characterization of a new member HRP-4 and classification of its subfamilies. *Biochem. J.* 2002;366(Pt 2):491-500.

24. Everett AD, Lobe DR, Matsumura ME, Nakamura H, McNamara CA. Hepatoma-derived growth factor stimulates smooth muscle cell growth and is expressed in vascular development. *J. Clin. Invest.* 2000;105(5):567-575.

25. Hu T-H, Huang C-C, Liu L-F, et al. Expression of hepatoma-derived growth factor in hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2003;98(7):1444-1456.

26. Thakar K, Kröcher T, Savant S, et al. Secretion of hepatoma-derived growth factor is regulated by N-terminal processing. *Biol. Chem.* 2010;391(12):1401-1410.

27. Abouzied MM, El-Tahir HM, Prenner L, et al. Hepatoma-derived growth factor. Significance of amino acid residues 81-100 in cell surface interaction and proliferative activity. *J. Biol. Chem.* 2005;280(12):10945-10954.

28. Wang C-H, Davamani F, Sue S-C, et al. Cell surface heparan sulfates mediate internalization of the PWWP/HATH domain of HDGF via macropinocytosis to fine-tune cell signalling processes involved in fibroblast cell migration. *Biochem. J.* 2010;433(1):127-138.

29. Everett AD. Identification, cloning, and developmental expression of hepatoma-derived growth factor in the developing rat heart. *Dev. Dyn.* 2001;222(3):450-458.

30. Enomoto H, Yoshida K, Kishima Y, Okuda Y, Nakamura H. Participation of hepatoma-derived growth factor in the regulation of fetal hepatocyte proliferation. *J. Gastroenterol.* 2002;37 Suppl 14:158-161.

31. Lepourcelet M, Tou L, Cai L, et al. Insights into developmental mechanisms and cancers in the mammalian intestine derived from serial analysis of gene

expression and study of the hepatoma-derived growth factor (HDGF). *Development*. 2005;132(2):415-427.

32. Gallitzendoerfer R, Abouzied MM, Hartmann D, et al. Hepatoma-derived growth factor (HDGF) is dispensable for normal mouse development. *Dev. Dyn*. 2008;237(7):1875-1885.

33. Yamamoto T, Nakamura H, Liu W, et al. Involvement of hepatoma-derived growth factor in the growth inhibition of hepatocellular carcinoma cells by vitamin K(2). *J. Gastroenterol*. 2009;44(3):228-235.

34. Huang J-S, Chao C-C, Su T-L, et al. Diverse cellular transformation capability of overexpressed genes in human hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004;315(4):950-958.

35. Yoshida K, Tomita Y, Okuda Y, et al. Hepatoma-derived growth factor is a novel prognostic factor for hepatocellular carcinoma. *Ann. Surg. Oncol*. 2006;13(2):159-167.

36. Okuda Y, Nakamura H, Yoshida K, et al. Hepatoma-derived growth factor induces tumorigenesis in vivo through both direct angiogenic activity and induction of vascular endothelial growth factor. *Cancer Sci*. 2003;94(12):1034-1041.

37. Everett AD, Narron JV, Stoops T, Nakamura H, Tucker A. Hepatoma-derived growth factor is a pulmonary endothelial cell-expressed angiogenic factor. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol*. 2004;286(6):L1194-1201.

38. Tsang TY, Tang WY, Tsang WP, et al. Downregulation of hepatoma-derived growth factor activates the Bad-mediated apoptotic pathway in human cancer cells. *Apoptosis*. 2008;13(9):1135-1147.

39. Tsang TY, Tang WY, Tsang WP, et al. Mechanistic study on growth suppression and apoptosis induction by targeting hepatoma-derived growth factor in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Cell. Physiol. Biochem*. 2009;24(3-4):253-262.

40. Ren H, Chu Z, Mao L. Antibodies targeting hepatoma-derived growth factor

as a novel strategy in treating lung cancer. *Mol. Cancer Ther.* 2009;8(5):1106-1112.

41. Bernard K, Litman E, Fitzpatrick JL, et al. Functional proteomic analysis of melanoma progression. *Cancer Res.* 2003;63(20):6716-6725.

42. Hayashi E, Kuramitsu Y, Okada F, et al. Proteomic profiling for cancer progression: Differential display analysis for the expression of intracellular proteins between regressive and progressive cancer cell lines. *Proteomics.* 2005;5(4):1024-1032.

43. Yu Y, Shen H, Yu H, et al. Systematic proteomic analysis of human hepatocellular carcinoma cells reveals molecular pathways and networks involved in metastasis. *Mol Biosyst.* 2011;7(6):1908-1916.

44. Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, et al. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101(33):12130-12135.

45. Kim J-E, Tannenbaum SR, White FM. Global phosphoproteome of HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *J. Proteome Res.* 2005;4(4):1339-1346.

46. Ali NA, Molloy MP. Quantitative phosphoproteomics of transforming growth factor- β signaling in colon cancer cells. *Proteomics.* 2011;11(16):3390-3401.

47. Clermont F, Gonzalez NS, Communi D, et al. HDGF is dephosphorylated during the early steps of endothelial cell apoptosis in a caspase-dependent way. *J. Cell. Biochem.* 2008;104(4):1161-1171.

48. Everett AD, Yang J, Rahman M, Dulloor P, Brautigan DL. Mitotic phosphorylation activates hepatoma-derived growth factor as a mitogen. *BMC Cell Biol.* 2011;12:15.

49. Thakar K, Niedenthal R, Okaz E, et al. SUMOylation of the hepatoma-derived growth factor negatively influences its binding to chromatin. *FEBS J.* 2008;275(7):1411-1426.

50. Prasad DD, Ouchida M, Lee L, Rao VN, Reddy ES. TLS/FUS fusion domain of TLS/FUS-erg chimeric protein resulting from the t(16;21) chromosomal

translocation in human myeloid leukemia functions as a transcriptional activation domain. *Oncogene*. 1994;9(12):3717-3729.

51. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. 1987;162(1):156-159.

52. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.

53. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods*. 2009;6(5):359-362.

54. Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*. 1989;56(3):379-390.

55. Chen CY, Gherzi R, Andersen JS, et al. Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes Dev*. 2000;14(10):1236-1248.

56. Padilla PI, Uhart M, Pacheco-Rodriguez G, et al. Association of guanine nucleotide-exchange protein BIG1 in HepG2 cell nuclei with nucleolin, U3 snoRNA, and fibrillarin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105(9):3357-3361.

57. Bandyopadhyay S, Sengupta TK, Fernandes DJ, Spicer EK. Taxol- and okadaic acid-induced destabilization of bcl-2 mRNA is associated with decreased binding of proteins to a bcl-2 instability element. *Biochem. Pharmacol*. 2003;66(7):1151-1162.

58. Sengupta TK, Bandyopadhyay S, Fernandes DJ, Spicer EK. Identification of nucleolin as an AU-rich element binding protein involved in bcl-2 mRNA stabilization. *J. Biol. Chem*. 2004;279(12):10855-10863.

59. Ishimaru D, Zuraw L, Ramalingam S, et al. Mechanism of regulation of bcl-2 mRNA by nucleolin and A+U-rich element-binding factor 1 (AUF1). *J. Biol. Chem*. 2010;285(35):27182-27191.

60. Schmidt TGM, Skerra A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc*. 2007;2(6):1528-1535.

61. Trinkle-Mulcahy L, Boulon S, Lam YW, et al. Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *J. Cell Biol.* 2008;183(2):223-239.
62. Collis SJ, DeWeese TL, Jeggo PA, Parker AR. The life and death of DNA-PK. *Oncogene.* 2005;24(6):949-961.
63. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* 2001;27(3):247-254.
64. Espejel S, Martín M, Klatt P, et al. Shorter telomeres, accelerated ageing and increased lymphoma in DNA-PKcs-deficient mice. *EMBO Rep.* 2004;5(5):503-509.
65. Vogel H, Lim DS, Karsenty G, Finegold M, Hasty P. Deletion of Ku86 causes early onset of senescence in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999;96(19):10770-10775.
66. Tong WM, Cortes U, Wang ZQ. Poly(ADP-ribose) polymerase: a guardian angel protecting the genome and suppressing tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001;1552(1):27-37.
67. Takahashi S, Nakae D, Yokose Y, et al. Enhancement of DEN initiation of liver carcinogenesis by inhibitors of NAD⁺ ADP ribosyl transferase in rats. *Carcinogenesis.* 1984;5(7):901-906.
68. Epstein JH, Cleaver JE. 3-Aminobenzamide can act as a cocarcinogen for ultraviolet light-induced carcinogenesis in mouse skin. *Cancer Res.* 1992;52(14):4053-4054.
69. Masutani M, Nozaki T, Nishiyama E, et al. Function of poly(ADP-ribose) polymerase in response to DNA damage: gene-disruption study in mice. *Mol. Cell. Biochem.* 1999;193(1-2):149-152.
70. Espejel S, Klatt P, Ménissier-de Murcia J, et al. Impact of telomerase ablation on organismal viability, aging, and tumorigenesis in mice lacking the DNA repair proteins PARP-1, Ku86, or DNA-PKcs. *J. Cell Biol.* 2004;167(4):627-638.

71. Ginisty H, Amalric F, Bouvet P. Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *EMBO J.* 1998;17(5):1476-1486.
72. Bouvet P, Diaz JJ, Kindbeiter K, Madjar JJ, Amalric F. Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. *J. Biol. Chem.* 1998;273(30):19025-19029.
73. Miniard AC, Middleton LM, Budiman ME, Gerber CA, Driscoll DM. Nucleolin binds to a subset of selenoprotein mRNAs and regulates their expression. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(14):4807-4820.
74. Mi Y, Thomas SD, Xu X, et al. Apoptosis in leukemia cells is accompanied by alterations in the levels and localization of nucleolin. *J. Biol. Chem.* 2003;278(10):8572-8579.
75. Grinstein E, Shan Y, Karawajew L, et al. Cell cycle-controlled interaction of nucleolin with the retinoblastoma protein and cancerous cell transformation. *J. Biol. Chem.* 2006;281(31):22223-22235.
76. Jiang B, Zhang B, Liang P, et al. Nucleolin/C23 mediates the antiapoptotic effect of heat shock protein 70 during oxidative stress. *FEBS J.* 2010;277(3):642-652.
77. Take M, Tsutsui J, Obama H, et al. Identification of nucleolin as a binding protein for midkine (MK) and heparin-binding growth associated molecule (HB-GAM). *J. Biochem.* 1994;116(5):1063-1068.
78. Bose S, Basu M, Banerjee AK. Role of nucleolin in human parainfluenza virus type 3 infection of human lung epithelial cells. *J. Virol.* 2004;78(15):8146-8158.
79. Semenkovich CF, Ostlund RE, Olson MO, Yang JW. A protein partially expressed on the surface of HepG2 cells that binds lipoproteins specifically is nucleolin. *Biochemistry.* 1990;29(41):9708-9713.
80. Nisole S, Krust B, Callebaut C, et al. The anti-HIV pseudopeptide HB-19 forms a complex with the cell-surface-expressed nucleolin independent of heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 1999;274(39):27875-27884.

81. Teng Y, Girvan AC, Casson LK, et al. AS1411 alters the localization of a complex containing protein arginine methyltransferase 5 and nucleolin. *Cancer Res.* 2007;67(21):10491-10500.
82. Bates PJ, Laber DA, Miller DM, Thomas SD, Trent JO. Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp. Mol. Pathol.* 2009;86(3):151-164.
83. Borggrefe T, Wabl M, Akhmedov AT, Jessberger R. A B-cell-specific DNA recombination complex. *J. Biol. Chem.* 1998;273(27):17025-17035.
84. Yanagida M, Shimamoto A, Nishikawa K, et al. Isolation and proteomic characterization of the major proteins of the nucleolin-binding ribonucleoprotein complexes. *Proteomics.* 2001;1(11):1390-1404.
85. Inder KL, Lau C, Loo D, et al. Nucleophosmin and nucleolin regulate K-Ras plasma membrane interactions and MAPK signal transduction. *J. Biol. Chem.* 2009;284(41):28410-28419.
86. Mao J, Xu Z, Fang Y, et al. Hepatoma-derived growth factor involved in the carcinogenesis of gastric epithelial cells through promotion of cell proliferation by Erk1/2 activation. *Cancer Sci.* 2008;99(11):2120-2127.
87. Jerke U, Tkachuk S, Kiyan J, et al. Stat1 nuclear translocation by nucleolin upon monocyte differentiation. *PLoS ONE.* 2009;4(12):e8302.
88. Dambara A, Morinaga T, Fukuda N, et al. Nucleolin modulates the subcellular localization of GDNF-inducible zinc finger protein 1 and its roles in transcription and cell proliferation. *Exp. Cell Res.* 2007;313(17):3755-3766.
89. Ginisty H, Sicard H, Roger B, Bouvet P. Structure and functions of nucleolin. *J. Cell. Sci.* 1999;112 (Pt 6):761-772.
90. Liao F, Dong W, Fan L. Apoptosis of human colorectal carcinoma cells is induced by blocking hepatoma-derived growth factor. *Med. Oncol.* 2010;27(4):1219-1226.
91. Hockenbery D, Nuñez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death.

Nature. 1990;348(6299):334-336.

92. Abdelmohsen K, Tominaga K, Lee EK, et al. Enhanced translation by Nucleolin via G-rich elements in coding and non-coding regions of target mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2011. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737422>. Accessed August 24, 2011.

93. Mongelard F, Bouvet P. Nucleolin: a multiFACeTed protein. *Trends Cell Biol.* 2007;17(2):80-86.

94. Angelov D, Bondarenko VA, Almagro S, et al. Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *EMBO J.* 2006;25(8):1669-1679.

95. Orphanides G, LeRoy G, Chang CH, Luse DS, Reinberg D. FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell*. 1998;92(1):105-116.

96. Zhao J, Yu H, Lin L, et al. Interactome study suggests multiple cellular functions of hepatoma-derived growth factor (HDGF). *J Proteomics*. 2011. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21907836>. Accessed September 18, 2011.

8 Anhang

8.1 Massenspektrometrie

8.1.1 Mascot Report-Listen der identifizierten Proteine aus der tryptischen Spaltung von Proteinen aus SDS-Gelen

Für die massenspektrometrischen Ergebnisse aus der ESI-Ionenfalle wurden sogenannte Mascot-Reports mit den Rohdaten der identifizierten Peptide im Analyse-Programm BioTools™ unter Verwendung des Mascot Algorithmus 2.2.02 erzeugt. Für die Analyse der Proteine aus SDS-Gelen wurden die Daten der ersten 10 Proteine dargestellt. Für die Analyse der Proteine aus den Eluaten ohne vorherige Auftrennung im SDS-Gel wurden die ersten 20 Proteine dargestellt.

Spectrum Analysis Report

Date: 10/11/2011 Time: 13:30

FileName: H:\Franken\100519\Stephie Probe4 BD4 01 7292.d\Stephie Probe4 BD4 01 7292.maf

Entries	Meas.	M/z	Calc.	MH+	Int.	z	Dev.(ppm)	Score	MascotScore	Rt(min)	Range	Sequence
1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
4	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
9	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
10	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
11	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
12	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
13	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
14	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
15	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
16	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
17	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
18	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
19	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
20	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
21	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
22	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
23	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
24	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
25	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
26	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
27	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
28	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10	100.0
29	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	0.0	100.0	100.0	1.0	1-10</	

[illegible]

MSMS 347 847.724 2541.226 132403.000 3+ -27.183 13 12 26.000 6163 - 6182 FWCDHMSLIVTIKDTQDFIR 3: Carbamidomethyl (C) 6: Oxidation (M)

[illegible]

MW-520710 860

Digest Matches

Entries	Meas. M/z	Calc. MH+	Int. z	Dev.(ppm)	Score	MascotScore	Rt(min)	Range	Sequence
1	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
2	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
3	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
4	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
5	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
6	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
7	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
8	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
9	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
10	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
11	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
12	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
13	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
14	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
15	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
16	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
17	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
18	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
19	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
20	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
21	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
22	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
23	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
24	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
25	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
26	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
27	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
28	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
29	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
30	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
31	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
32	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
33	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
34	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
35	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
36	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
37	100.053	100.053	1	0.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
38	100.053	100.053							

MSMS 10 785.698 785.488 114994.000 1 267.747 5 4 36.800 1020 - 1026 VVVNVIK
MSMS 861 795.572 795.425 120428.000 1 185.444 8 5 35.600 3358 - 3364 LTA5FEK
MSMS 545 428.965 855.428 55651.000 2 106.139 5 6 29.300 2770 - 2776 MLE4YAK
MSMS 545 847.955 1694.911 22092.000 4 - 9.981 7 2 18.100 3732 - 3737 FAKASITEIVLNDK
MSMS 686 878.175 1758.393 22092.000 4 - 9.981 7 2 18.100 3742 - 3756 AAVVHFAIEAEOAK
MSMS 488 768.190 2303.131 30957.000 2 250.053 11 16 28.300 266 - 284 LUNGLHLSPOAELDFWMRM 17: Oxidation (M) 18: Oxidation (M)
MSMS 978 788.544 2304.067 38103.000 2 280.686 12 16 39.200 497 - 516 GAILNGVQHMSEELMEELK 11: Oxidation (M) 19: Carbamidomethyl (C)
MSMS 978 788.544 2304.067 38103.000 2 280.686 13 12 39.200 497 - 516 GAILNGVQHMSEELMEELK 16: Oxidation (M) 19: Carbamidomethyl (C)
MSMS 978 788.544 2304.067 38103.000 2 280.686 13 12 39.200 497 - 516 GAILNGVQHMSEELMEELK 15: Oxidation (M) 19: Carbamidomethyl (C)
MSMS 978 897.178 2624.118 83733.000 1 70.491 3 13 25.700 905 963 3276 VQDFGLQVHAEFLFELK 20: Carbamidomethyl (C)

Talin-2 OS=Homo sapiens GN=TLN2 PE=1 SV=4 TLN2 HUMAN

Talm-2ZRDHREKEMENGLN2PZPZL2ZHU2MAN
 KVEE2G2T2K2L2R2D2K2L2K2A2L2H2D2D2L2M2L2R2F2R2E2G2V2D2D2L2R2K2F2F2L2K2V2D2N2D2R2V2L2Q2V2A2D2I2N2G2S2P2F2E2K2F2G2V2Q2G2P2H2V2H2K2P2G2L2K2F2L2P2K2Y2K2R2
 G2A2E2R2I2P2Q2H2K2N2G2E2E2A2K2V2Y2K2L2A2R2S2L2R2Y2C2V2F2L2R2E2K2M2K2N2L2P2L2R2L2I2K2D2N2V2M2R2E2V2L2Q2E2W2L2P2K2W2A2S2P2F2L2D2G2E2Y2G2S2V2S2T2D2E2G2I2Q2A2I2D2I2L2K2K2S2K2D2R2F2
 D2E2L2N2E2L2E2S2V2K2S2I2L2Q2N2P2R2Q2A2E2H2G2V2A2P2M2R2S2G2E2P2T2N2V2M2P2S2P2Q2V2M2Q2H2R2G2H2V2L2I2S2A2Q2A2L2M2I2N2S2H2A2V2Q2A2D2L2S2D2L2P2Q2A2N2V2N2K2V2S2E2H2S2Q2A2
 I2A2G2A2S2V2L2Q2D2P2A2D2I2T2A2G2A2I2T2I2S2M2L2K2E2P2Q2L2A2L2M2D2E2R2L2A2R2A2G2A2S2D2L2A2V2Q2T2E2G2P2F2V2T2A2G2I2Q2A2Q2D2L2I2N2G2E2T2D2F2H2Q2A2L2A2N2A2M2V2L2K2A2
 P2A2S2V2Q2A2T2D2N2M2R2S2D2A2E2I2N2E2K2S2K2A2L2L2A2D2T2A2R2V2E2A2K2A2N2E2D2Q2E2L2A2E2B2L2R2V2A2T2N2A2Q2A2I2K2K2V2I2N2G2E2T2Q2I2A2S2N2A2V2N2K2P2A2Q2O2L2Q2S2K2A2V2D2I2P2
 L2Q2V2G2R2S2Q2A2E2L2S2A2Q2L2I2S2O2N2F2L2P2G2K2M2S2V2D2Q2A2M2L2S2C2A2K2N2L2A2E2L2A2R2T2A2S2E2R2A2G2C2M2E2I2D2A2L2N2T2Q2L2K2N2E2Q2A2M2A2V2S2Q2L2P2K2E2T2Q2A2D2L2Q2S2K2V2S2G2M2S2
 L2K2I2C2A2Q2A2N2E2T2A2Q2L2A2Q2A2R2G2V2A2S2T2D2A2A2H2M2D2A2R2D2S2C2A2M2I2Q2E2A2L2I2P2A2D2A2R2Q2R2A2L2Q2A2V2S2H2L2N2K2D2P2Q2D2V2A2L2S2I2G2E2K2S2L2D2L2P2S2T2P2Q2A2S2
 E2L2M2A2Q2I2A2N2D2I2N2S2A2G2E2V2H2A2T2R2G2Q2S2L2A2A2K2G2F2D2P2L2D2A2I2H2A2Q2A2Q2E2D2Q2I2V2I2N2G2I2N2S2I2M2A2S2K2L2A2R2S2L2D2V2P2G2A2P2A2N2L2A2A2R2A2V2S2I2N2G2L2I2T2Q2A2P2A2K2C2D2N2A2L2E2T2R2V2M2G2I2D2
 E2N2E2P2S2I2D2S2V2S2P2G2M2K2V2E2S2A2G2I2S2N2A2K2T2F2D2E2G2I2S2A2K2S2A2L2K2E2A2Q2M2A2V2I2D2S2N2S2Q2A2G2V2D2I2P2A2R2A2Q2I2M2A2C2N2V2D2S2G2S2P2S2V2A2I2K2R2S2L2N2C2K2A2R2S2I2T2
 I2N2E2S2V2S2P2G2M2K2V2E2S2A2G2I2S2N2A2K2T2F2D2E2G2I2S2A2K2S2A2L2K2E2A2Q2M2A2V2I2D2S2N2S2Q2A2G2V2D2I2P2A2R2A2Q2I2M2A2C2N2V2D2S2G2S2P2S2V2A2I2K2R2S2L2N2C2K2A2R2S2I2T2
 P2A2Q2R2C2Q2S2I2D2I2N2C2I2R2I2E2Q2A2S2A2V2S2Q2L2A2R2D2I2S2E2A2V2Q2L2D2I2P2V2E2I2G2H2I2D2I2P2A2T2A2R2G2A2Q2L2V2T2A2S2F2E2L2I2A2V2A2G2S2K2I2D2H2Q2A2V2S2K2I2D2H2Q2A2V2L2D2T2K2I2E2A2S2Q2M2I2A2K2E2G2N2Q2A2H2I2
 I2D2A2E2A2Q2L2K2E2A2V2D2I2N2E2A2V2E2L2G2V2M2D2A2I2E2A2M2S2L2D2G2T2P2P2K2Q2I2D2V2T2V2K2Y2S2A2I2G2V2E2M2T2K2S2N2P2E2E2L2G2A2S2V2L2I2D2H2A2L2P2Q2M2A2A2A2E2F2E2I2Q2I2R2T2V2D2L2G2H2C2I2F2
 I2K2A2G2A2L2Q2V2C2T2D2S2I2K2E2I2C2A2R2E2A2V2S2L2V2S2A2L2Q2A2G2N2Q2A2C2I2T2A2V2S2I2A2D2I2T2I2P2A2T2A2L2N2A2E2S2T2A2D2R2H2E2I2L2K2A2L2V2D2T2L2L2V2S2A2C2I2D2K2A2Q2A2S2A2I2T2Q2A2V2E2L2G2A2S2L2
 I2K2A2G2I2P2Q2V2I2N2A2K2D2A2R2S2L2I2S2A2G2A2K2P2D2V2D2S2P2M2I2Q2A2K2V2M2N2T2S2L2I2K2A2V2E2A2D2T2R2G2A2E2L2A2T2I2Q2E2L2V2T2D2K2P2E2K2T2S2P2E2S2I2R2M2K2I2D2T2A2A2V2A2G2N2S2R2E2D2V2I2A2N2
 I2K2A2S2D2M2L2T2A2I2K2A2S2D2M2L2T2A2I2R2P2E2C2T2G2L2I2D2V2L2L2Q2P2T2F2E2Q2L2A2K2S2R2V2K2E2I2Q2A2A2E2N2E2W2P2D2I2V2I2A2E2L2G2A2N2A2E2A2K2L2Q2L2K2P2A2K2F2D2E2F2Q2I2
 I2K2A2S2D2M2L2T2A2I2K2A2S2D2M2L2T2A2I2R2P2E2C2T2G2L2I2D2V2L2L2Q2P2T2F2E2Q2L2A2K2S2R2V2K2E2I2Q2A2A2E2N2E2W2P2D2I2V2I2A2E2L2G2A2N2A2E2A2K2L2Q2L2K2P2A2K2F2D2E2F2Q2I2
 D2D2D2V2V2T2F2G2V2Q2I2A2I2A2Q2E2M2K2R2E2L2E2A2K2L2Q2I2R2Q2O2Y2F2L2I2D2E2R2E2G2

MW-271443 390

Digest Matches

Entries	Meas.	M/z	Calc.	MH+	Int.	z	Dev.(ppm)	Score	MascotScore	Rt(min)	Range	Sequence
1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
4	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
9	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
10	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
11	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
12	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
13	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
14	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
15	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
16	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
17	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
18	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
19	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
20	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
21	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
22	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
23	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
24	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
25	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
26	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
27	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
28	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
29	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.0	100.0	100.0	10.0	1-10	...
30	100.0	100.0	100.0									

MSMS 519 584 421 1367 686 79640 000 2+ 194 504 8 8 28 800 667 676 FODVLMASLAK 6: Oxidation (M)
 MSMS 598 457 680 13170 419 454 1900 3+ 150 881 79 16 30 000 677 690 AVANNAAMLLVKA
 MSMS 153 739 901 2217 143 52348 000 3+ 246 076 47 22 300 593 619 GKVLAAALMDVEFGSGDQLLR 9: Oxidation (M)
 MSMS 248 817 817 2451 259 116226 000 3+ 72 221 23 19 224 190 1187 109 LAQVAKAVVSHSLNLCALPAGDK 18: Carbamidomethyl (C)
 MSMS 342 819 179 2456 116 258811 000 3+ 271 241 11 12 25 900 12 32 HCNVDTMGEQFEPSTAVYADCR 20: Carbamidomethyl (C)
 MSMS 342 819 179 2675 301 83733 000 3+ 291 293 11 12 26 700 125 1183 DMVMSGAMIEAKQALPAGDAER 8: Oxidation (M)
 MSMS 342 819 179 2675 301 83733 000 3+ 291 293 11 12 26 700 125 1183 DMVMSGAMIEAKQALPAGDAER 8: Oxidation (M)

Spectrum Analysis Report

Date: 10/12/2011 Time: 16:35

FileName: H:\Stephie\100507\StephieProbe5_BC5_01_7194.d\StephieProbe5_BC5_01_7194.mgf

LCINELTGDIVSCAGTYIHVMSINGNPVSVNTFTGRSQIICCMSEMNEWDTQNVIVTGHSDGVVRFWRMEFLQVPETPAPEPAEVLEMQEDCPAQIGQEAQDESDSDSEADEQSIQDPKDTSPSPSSTSHRPR
AASCRATAAWCTDSGSDSRWSQLSLDEKDGFI FVNYSEGQTRAHLQGPLSHPHNP IEVRNYSRLKPGYRWERQLVFRSLTMHTAFDRKDNHAPAEVTALGISKDHSLILVGDSRGRVFSWSVSDQPGRSAADH
WVKDEGGDSCSGSVRFLSTERRHRCNCGQLFCQKSRFQSEIKRLKISSPVRVCNCCYNNLQHERGSEGDGPRNC

MW:395006.420

Digest Matches (Score: 36.12)

Score = 36.120000, Rank = 7, Database = SwissProt, Accesskey = WDFY3_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 100 945.110 1888.945 32910.000 2+ 142.007 4 36 20.000 2082 - 2097 RSQGLSLDAVYHCLNR 13: Carbamidomethyl (C)

CARTILAGE OLIGOMERIC MATRIX PROTEIN OS=HOMO SAPIENS GN=COMP PE=1 SV=2 COMP_HUMAN

MVPTACVLLLTAAALGASGGQSPFLGSDLGQMLRELQETNAALQDVRELLRQVREITFLKNTVMBCDACGMQSVRTGLP8VRPLLHCAPGFCFPGVACIQTESGARCGPCPAGFTNGNSHCTDVNECNAPHCFFP
RVRCINTSPCFRCEACFPFGTQVGLAFAKANKVCTDIMECETIGBNVCVNSVCINTRGSPQCPCOPGVGDQASGQRRAGRFCDGSPSCHEHADCVLERDGRSCVCVAVGAWGNGLICGRDTLDGFP
DEXLRCPERQCRKDMCVTVFNSGGQEDVDRDGI GDACDPDADGCVNEKNCPLVFNPDQRNTDEKWDGACDNCRSQKNDQKQTDQDGRGDACDDIDGDRIRNGADNCPRPVNSDQKSDGGLGDACDNCPCQKS
NPDQADVHDHFDVGDACSDQDQDGDGHQDSRDNCPTVPNSAQEDSDHGGQGDACDDDDNDGVPDSRDNCRLVPNPGQEDADRQDGVGDVQDDFDADKVVDKIDVCPENAEVTLTDFAFQTVVLDPEGDAQIDPNWV
VLNQGRELVQTMNSDPLGAVGTAFNGVDFEGTFHNTVTDODYAGFIFGYQDSSSFVVMWKMGEQTYQAMFRAVAEPGIQLKAVKSSSTGPGEQLRNALWHTGDTESQVRLWKDPRNVGWKDKKSYRWFQLQHRP
QVGYIRVRFYEGPELVADSNVVDLTTMRGRLGVFCFSGENI I WANLRYRCNDTIPEDYETHQLRQA

Digest Matches (Score: 35.11)

Score = 35.110000, Rank = 8, Database = SwissProt, Accesskey = COMP_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 506 653.752 1959.787 42701.000 3+ -278.657 20 35 32.000 306 - 325 DGIQDAGCPDADGGVPNEK

Nucleolar RNA helicase 2 OS=Homo sapiens GN=DDX21 PE=1 SV=5 DDX21_HUMAN

MPGLRSDAGLESDTAMKKGETLRKQTEEEKKKPKSKDKTEETAEAEETVFPKAKQVKKKAEPSEVDMNSPKSKAKKKKEEPSQNDISPKTKSLRKKKKEIEKKVVSSTKTKVTKNEEPSEEEIDAPKPKMKKEKE
MNGETREKSPKLNKGFPHPEPCNPSAAEESNSEIEQEIPVEQKEGAFSNFPISEETIKLLKRGVTFLFPIQAKTFHHVYSKDLIAQARTGTGKTFSPAIPLEKLHGELQDRKRGAPQVLVLAPTRELANQV
SKDFSIDIIRKLSVACFYGGTFYGGQFERMRNGIDILVOTPGRIKDHIONGLDLTKLKHVLDVQMLDMGFPADQVEEILSVAYKDSNDPOTLLFSATCPHWVFNVAKKYMKSTYEQVDLIGKTKTQRTALTVEHL
AIKCHWFORAAVIGDVIIRVYSHGQRTTIPCEKKEAQELSGNSAIIQDAQSLHDDIPQKREITLKGRNGSFGVLVATNWAARGLDIPEVDLVQSSPPQVSEYIHRSGRTGRAGRGVCICFYQKKEEYQLVQV
EQKAGIKFKRIGVPSATETIKASSKDAIRLLDSVPPTAISHFQKSAEKLEEKGAVEALAAALAHISGATSDVQRSLINSNVGFVTMILQCSITEMPNISYANKELKEQLGEEIDSKVKGMVFLKGLKGLVCFDVPPTASV
TEIEKWHDSRRRLQSVATATQPELEGPREGYGGFRGQREGSRGFRGQRDGNRRFRGREGSRGPRGQRSGGGNKSNSRQNKQKRSFSKAFQ

MW:87290.380

Digest Matches (Score: 34.24)

Score = 34.240000, Rank = 9, Database = SwissProt, Accesskey = DDX21_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 231 457.247 913.547 19295.000 2+ -65.546 30 20 24.400 424 - 432 AAVIGDVI

MSMS 301 582.939 1164.710 22327.000 2+ 138.189 141 34 26.600 260 - 270 APQVLVLAPTR

MSMS 336 762.995 1524.842 34126.000 2+ 92.313 16 11 27.700 582 - 595 LLSVPPTAISHFK



Abbildung 8-3: Mascot-Report für PARP-1.

Aufgeführt ist hier eine Liste experimenteller Daten der ersten zehn identifizierten Proteine der Probe, wobei PARP-1 das erste spezifisch identifizierte Protein darstellte.

Spectrum Analysis Report				
Date: 10/11/2011 Time: 13:19				
FileName: H:\Stephie\100507\StephieProbe3_BC3_01_7190.d\StephieProbe3_BC3_01_7190.mgf				
Sequence Name:	1.008	Parentmass:	0.000	Mass Error: -1.008
MH+ (mono):				
Sequence data:				
Intensity Coverage:	0.0 % (0 crnts)	Sequence Coverage MS:	0.0%	
Sequence Coverage MS/MS:	0.0%	pI (isoelectric point):	0.0	
Acquisition Parameter:				
Processing Parameter:				
Display Parameter:				
Parentmass:	0.000	Mass Error:	-1.008	MH+ (mono): 1.008
MH+ (avg):	1.008	Tolerance (Da):	0.500	Number of Peaks: 0
Above Threshold:	0	Assigned Peaks:	0	
Matched Sequences:				
Unmatched				
Global peptide results				
Poly [ADP-ribose] polymerase 1 OS=Homo sapiens GN=PARP1 PE=1 SV=4 PARP1_HUMAN				
MAESSDKLYRVEYAKSGRASCCKCESIPKDSLRMAIMVQSPMFDGKVPWHYHSCFWKGVGHSIRHPDEVVDGFSLELWDDQKVKKTAEGAGVTGKGQDGIGSKAEKTLGDFAAEYAKSNRSTCKGCMKEKIEKGQVR				
LSKMKVDPEHPQGLGIMIDRWYHGPCFVNRREELGFRPEYASQKLGFSLLATEDKALKKQLPGVKSEGRKRGDEVDGDEVAKKSKKEKDKDQSKLEKALKAQNDLIWNIKDELKVCSTNDLKEKLLIFNKQVPSGE				
SAILDRVADQHWGALLPCEECGQQLVEKSDAFTCTGDVTAWKCMVCTQTPNKRVEVTFPEFFRISVLLKLVKKODRIFPPETGASVAATPPSTASAPAAVNSGASADKPLGNKLLTLGKLRNKOEVKAMIEK				
LQGLCTGTANKASLCISTKKEVEKMKMKMEVEKEANIRVVSDFLDVGSASTKSLQELFLAHILSPWGAEVKAEPEVVPVAPRGKSGAALSKSKSQVQVEBGINSEKRMKLTGKGAAVDPDSGLBHSAAVLEKGGKV				
FSATLGLVDIVKGTNSYYKLQLEDDKKNRYWIFRSWGRVGTIVIGSNKLEQMPKSKDEAIEHFMLKYEEKTGNWHSKNFTYKPKFFYLEIDYGQDEEAVKLTVPNGTKSKLPKVPQDLIKMIPDVEESMKAMVEYE				
IDLQKMPGLGLSKRQIAQAYSILSEVQQAQVSGSSDQLDLSNRFYTLIPHDGFMKKPPLNNADSVQARVEMLDNLLDIEVAYSLLLGGSDSSKDPIDVNYEKLKTDIKVVDORDSEAEIIRKVKNTATTHNA				
YDLEVIDIFKIEREGEQRYKPFQQLHNRLLMHWGSRRTTNFAGILSQGLRIAPPEAFVTGVMFGKGIYFADVMSKANYCHTSQGDPIGLILLGEVALGNMYLKHASHISKLFGKRGSVKLGKGTTPDPSANISLGD				
VDVPLGTGIGSSGVNDSLLINYEIVYDIAQVNLKLLKLFNFKTSLW				
MW:113012.390				
Digest Matches (Score: 286.78)				
Score = 286.780000, Rank = 1 Database = SwissProt, Accesskey = PARP1_HUMAN				
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.000000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta				
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence				
MSMS 422 392.797 784.414 54975.000 2+ 220.401 41 9 29.200 583 - 587 YWIFR				
MSMS 207 434.792 868.479 55032.000 2+ 112.898 31 18 22.800 859 - 865 LLWHGSR				
MSMS 360 438.785 876.519 39127.000 2+ 50.052 33 19 27.200 263 - 269 ELLIFNK				
MSMS 394 565.848 1130.555 36158.000 2+ 114.801 148 42 28.400 894 - 903 GIYFADMVSK				
MSMS 291 573.808 1146.550 25596.000 2+ 51.289 577 32 25.400 894 - 903 GIYFADMVSK 7: Oxidation (M)				
MSMS 331 593.396 1185.579 73059.000 2+ 173.998 67 24 26.300 109 - 119 TLGDFAAEYAK				
MSMS 522 681.489 1361.804 70267.000 2+ 122.599 97 93 31.700 552 - 564 VFSATLGLVDIVK				
MSMS 306 456.055 1365.846 79443.000 3+ 222.782 1031 34 25.800 663 - 674 SKLPKVPQDLIK				
MSMS 454 689.470 1377.748 99522.000 2+ 133.821 521 75 29.800 866 - 878 TTNFAGILSQGLR				
MSMS 485 459.997 1377.748 30091.000 3+ 165.580 46 13 30.200 866 - 878 TTNFAGILSQGLR				
MSMS 484 490.335 1468.729 87866.000 3+ 177.902 42 12 30.700 736 - 747 FYTLIPHDFGMK				
MSMS 210 748.006 1494.827 37351.000 2+ 118.681 32 32 22.900 748 - 761 KPPLNNADSVQAK				
MSMS 458 526.652 1577.803 34836.000 3+ 87.664 37 29 29.900 879 - 893 IAPPEAPVTGYMFGK				
MSMS 448 789.487 1577.803 67492.000 2+ 103.694 29 24 29.800 879 - 893 IAPPEAPVTGYMFGK				
MSMS 378 532.021 1593.798 54251.000 3+ 157.151 64 23 27.800 879 - 893 IAPPEAPVTGYMFGK 12: Oxidation (M)				
MSMS 380 812.978 1624.806 94827.000 2+ 87.608 1157 95 27.900 453 - 467 VVSEDFLDVSASTK				
MSMS 391 812.979 1624.806 94827.000 2+ 88.837 516 79 28.300 453 - 467 VVSEDFLDVSASTK				
MSMS 227 600.039 1797.836 54473.000 3+ 148.103 4 9 23.400 608 - 621 EDIAEHFMKLYEEK 8: Oxidation (M)				
MSMS 311 675.362 2024.020 97780.000 3+ 25.664 98 31 25.900 166 - 182 NREELGFRPEYASQKL				
MSMS 487 734.793 2202.083 60485.000 3+ 128.067 27 18 30.900 820 - 838 NTHATTHNAYDLEVIDIFK				
Tubulin beta-2A chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2A PE=1 SV=1 TBB2A_HUMAN				
MREIVTHAQCGQCGIARFPEVLSGEIGDFGYSYSGSDQLGELINIVYINAEAGNVPVDEPCTGSDVSRGPPQIFRPDNPVFGQSGAGNNAWKGHYTEGAEVLDSVDVVRKESESCDCLQGFLTHS				
LOGQTSGQMGTLLLSKIREYVDPRIWNTFVSMPSKVSQVSTVVEPNATLSVQLVENTDDETSIDNEALYDICTPRTKLITPTGYDLNHLVSATMSGVTTCLRFPGQNLADRLKLANVMPFPLRHFMPMGFAPITSR				
GSGQYRALTVPELTQQMPSKNNMAACDPRHGRYLTVAAIFPRGRMSMEVDEQGMNVQNKNSYFVEWIPNNVKTAVCDIPRGLKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRKKAFILHWYTEGMDMEFTEASEN				
MNDLVSEYQYQDADADEGGEFEEDGEGDEA				
MW:49874.960				
Digest Matches (Score: 104.26)				
Score = 104.260000, Rank = 2 Database = SwissProt, Accesskey = TBB2A_HUMAN				
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.000000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta				
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence				
MSMS 542 980.039 1958.982 78389.000 2+ 45.412 513 74 32.300 104 - 121 GHYTEGAELVDSVLDVVR				
MSMS 528 653.750 1958.982 126872.000 3+ 129.542 85 58 32.000 104 - 121 GHYTEGAELVDSVLDVVR				
MSMS 389 724.767 2172.137 73998.000 3+ 68.881 3 11 28.200 360 - 379 GLKMSATFIGNSTAIQELFK 4: Oxidation (M)				
MSMS 6441120.044 3357.576 73238.000 3+ 161.319 4 10 35.400 122 - 154 KESESCDCLQGFLTHSLGGGTGSGMGTLLISK 26: Oxidation (M)				
MSMS 6611138.860 3414.587 117798.000 3+ -9.372 5 12 35.800 122 - 154 KESESCDCLQGFLTHSLGGGTGSGMGTLLISK 6: Carbamidomethyl (C) 26: Oxidation (M)				
Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A PE=1 SV=1 TBA1A_HUMAN				
MREICISIHVQAGVQIGNACWELCYCLEHGIQPDGMPSDKTIGGGDSFNFTFSETGAGKBVRAVYVQLEPTVIDEVRTGTYQLFHPPEQLITGKEDANNYARGHYTTGKEIIDLVLDRIKLDAGCTGLQGLFV				
HFSFGQTSGQFTSLMERISVDYGGKSKLFSYIPAPQVSTAVVEPYNSLITHTTHLESDCAFVMDNEAIDICRNLIDIERPTYTNLRLIGQIVSSITASLRFQDGLNVDLTFEQTNLVPPYRPHFPLATYAPVI				
SAEKAYHEQLSVARITNACFEPAQNVKCDPRHGRYMACCLYRGDVPKPDVNAIATIKTKRTIQFDVNCPTGFKVGINYQPTTVFVGGDLAKVQRAVCMLSNTTIAEAWARLDHFKFLDMYAKRAFPVHWYVGEHGE				
EGFSEAREDMALKEKYEEVGVDSVEGEGEGEEY				
MW:50103.610				
Digest Matches (Score: 56.43)				
Score = 56.430000, Rank = 3 Database = SwissProt, Accesskey = TBA1A_HUMAN				
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.000000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta				
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence				
MSMS 482 777.473 2330.018 239843.000 3+ 165.822 327 56 30.600 403 - 422 AFVHWYVYVGEHGESEAR				
Protrudin OS=Homo sapiens GN=ZFVY27 PE=1 SV=1 ZFY27_HUMAN				
MOTSEREGSGPELSPVMPPEAPLESPPFPPTKSPAFDLFNLVLSYKRLIYLEPLKDAGDGVRYLLRWMPPLCSLLTCLGLNVLFTLNEGAWYSVGLMISVPALLGYLQEVCRARLPDSELMRRKHYSVRQEDLRQ				
RLSRPEAVAEVKSFLIQLAEPLSLRCCCEAAYRVLHWENFVSSQFYGALLGTVCMLYLLPLCWLTLNLTSLFLGNVEFFRVVSEYRASLQQRHMPKQEEHAFESPPPPDVGKDGGLMDSTPALTPTEDLTGPGVE				
EAEAEPEDEEFKDAIEETHLVLEDDGAPCPAEDDELALQDNGFLSKNEHLRSKVSRLTERLKRKRPVNNFGNCTGCSATFSVLKRRSCSCNCGNSFCBRCSCSFVKPSSMGATAPEAQRETTFVFCASCNQTLSK				
MW:45813.740				
Digest Matches (Score: 42.95)				
Score = 42.950000, Rank = 4 Database = SwissProt, Accesskey = ZFY27_HUMAN				
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.000000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta				
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence				
MSMS 329 544.022 1629.761 38209.000 3+ 178.260 18 42 26.300 397 - 411 ETVFVCAASCNQTLSK				
PROTEASOME-ASSOCIATED PROTEIN ECM29 HOMOLOG OS=HOMO SAPIENS GN=ECM29 PE=1 SV=2 ECM29_HUMAN				
MAAAASASQDELNLQERVFLRLGHAETDELQNIISKFLPVLKLLSSYQEGVRKVKHLLVHLNKKIRSRPKQLPVPETLLVQYQDPAVASFTVNTFTI1YVKMGYPRLPVEKQCELAPLTLLTAMEGKPPQPDQSLM				
BioTools Version 3.1 Copyright © 1999-2007 Bruker Daltonik GmbH Page -1-				

Spectrum Analysis Report

Date: 10/11/2011 Time: 13:19

FileName: H:\Stephie\100507\StephieProbe3_BC3_01_7190.d\StephieProbe3_BC3_01_7190.mgf

IGSRRQPRAPKEKAQPLEDLASFQELSQTPGHTEELANGAADSFTSAPKQTPDSGKPLKISRRVLRAPKVEPVGDVVSTRDPVKSQSKNTSLPPLPFKRGGGKDGSVTGTKRLRCPAPEEIVEELPASKKQRVAPR
ARGKSSSEPVVIMKRLRTSARRIEPAEELNSDMKTNKEEHLQDSVPENKGISLRSRRQNKTEAEQQITEVFVLAERIEINRNNEKKPMKTSPEMDIQNPDDGARKPIPRDKVTENKRLRSARQNESSQPKVAEEESG
GQKSAKVLNQKQKGEAGNSDMCLRSRRTKSQPAASTLESKSVQVRVTRSVKRCAPKAEDNVCVKIRTRSHRDSEDI

Digest Matches (Score: 26.21)

Score = 26.210000, Rank = 10, Database = SwissProt, Accesskey = K167_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz:Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Mass, M/z Calc, MH+ Int, z Dev (ppm) Score MascotScore R1(min) Range Sequence

MSMS 190 402.331 803.444 16419.000 2+ 262.151 3 5 22.300 2581 - 2587 NTKIPCK

MSMS 306 456.055 1365.792 79443.000 3+ 262.447 19 26 25.800 537 - 548 KSLVMHTPPVLK 5: Oxidation (M)

MSMS 45 729.998 1458.671 51542.000 2+ 218.175 3 8 17.000 1861 - 1874 SPQSDPADTPTNTK

MSMS 424 747.146 2238.985 152466.000 3+ 195.777 5 14 29.200 1368 - 1388 TTKMPCESPPEADTPTSTR 4: Oxidation (M)



Spectrum Analysis Report

Date: 10/11/2011 Time: 13:31

FileName: H:\Franken\100519\Stephie_Probe5_BD5_01_7294.d\Stephie_Probe5_BD5_01_7294.mgf

MSMS 145 426.292 851.426 34034.000 2+ 177.513 136 36 22.000 269 - 277 GFSGLDGAK
MSMS 182 441.792 882.516 67064.000 2+ 69.349 30 15 22.800 959 - 967 GVVGLPQGR
MSMS 815 448.110 895.463 34512.000 2+ -280.042 6 17 34.000 1142 - 1152 GPPGSAGAPGK
MSMS 479 448.333 885.463 53427.000 2+ 218.585 1 3 28.100 1142 - 1152 GPPGSAGAPGK
MSMS 300 581.373 1161.572 224856.000 2+ 143.549 73 42 25.000 575 - 586 GOAGVMGFPGPK 6: Oxidation (M)
MSMS 339 581.415 1161.572 224856.000 2+ 215.928 76 29 25.600 575 - 586 GOAGVMGFPGPK 6: Oxidation (M)
MSMS 407 648.867 1296.658 86062.000 2+ 52.817 25 14 26.900 971 - 984 GFPGLPGSPSGEPK
Collagen alpha-1(II) chain OS=Homo sapiens GN=COL2A1 PE=1 SV=3 CO2A1_HUMAN
NIRLIGAPQTLVLLTLLVAALRRCQQDVQVAGSCVQDQGVNDKDVWKEPEKRICVCDTGTGVLDCDIICEDVDKCLSPFIIPFGECCPICPTDLATASQVPGPKQKQKGEPIKIDIVPGKPPGPGQPAGEQPGQDRG
DROEKGAPGPRRDCEPTFGNPPGPGPPPPGCLGNFPAQHAAGCFDEKAGAGLQWQCPMPMPGPGPGPAGAPGPGQGCQMPCEPEGPGVSGWPGKPGPPGPKGDDGEAGKPGKAGEGPGPGQAG
PFGTGLGPGVGHGYPDGLDKAEAGEAGPCVKEGSCSPGENSGPCMPQRLPGERGRTPGAGAAGARNNDGQPGPAGPGPGVPAGGPGPGAPGAKGEAGTCAARGPEGAQCPRGEGPTGPGSPGADAGSMPDTCG
IPGAQSGAGAPRIAGAPGPPGPPGPGQATGFLGPKQGTGEPGIAAGFKGEQPKGPGPGAGPQAGPAGEEGKRGARGEPPGVGPIGPPGERGAPGNRGPPGQDGLAGPKGAPGERGPGSLAGPKANGDPGRPG
EPGLPGAGRLTGQRDAGQPKVQPSGAPGEDGRGPPGPGQARGQPGVMGFGPGKGANEGPGKAGEKLPAGAPGLRGLPGKDGETGAAGPPGAPGAGERGEQAGPGPSFGQGLPGPPGPGEGGKPGDQGVPGEGAG
APGLVLPGRGEPGPGESGPGCAQLGPGRLPGTPTGDPKASGAPGPPGAQPGPLQGMHGERGAAGIAGPKDGRDGVCEKGPGEAGPKDGGRLTGPIPPGPAGANGEKEVGPVPPGPGAGSAGARAGAPGERGETG
PFGPAGPAGPGADQPKAKGQDEAGQKGDAGAPGPGPGSAGAPGPGPTGPGKARGAQCPGATGPGAAAGVPGPGSNNPDPFGPGPSKDGPKARGDGGPGGAGGEPGLQGPAGPGPEKGEFGDDGPGSG
AEGPPGPGCLAQGRQIVCLPGQREGRCPLGPGSGEPCKQAGPAGSGDRGPGCPVPGPLGTGPAGEPRGREGSGADGPGGRDGAAGVGDGRGETGAVGAPGAPCPGPGSPGAPGTPCKQDGRGEAGAGCPMPGSPAG
ARGIQPGQPGRGDKGEAGEPGERKESIRSPGSRKNPARTCDRLKLCHEPWNKSGDYVIDPQGTCLDMKVFNCMETGETCYVPNANVPKKNWSSKSKKKHIWFGETINGGFHFSYGDNDLAPNTANVQMTFLRL
LSTGEGSNTIYHCKNSIAYLDEAGNLKALLIQGSNDVEIRABGNSRPTIYALKDGCTHFKGWGKTIYBRSQKTSRLPIIDIAPMIDGGPEQFPGVDIGPVCL
MW:141698.500
Digest Matches (Score: 46.05)
Score = 46.050000, Rank = 3, Database = SwissProt, Accesskey = CO2A1_HUMAN
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence
MSMS 407 648.867 1296.658 86062.000 2+ 52.817 25 14 26.900 993 - 1006 GFPGLPGSPSGEPK
MSMS 321 717.163 2312.127 187518.000 3+ -282.187 16 14 25.300 858 - 884 GDAGAPGPGQSGAPGPGQPTGVTGPK
MSMS 274 823.769 2469.212 177308.000 3+ 32.704 5 3 24.500 1056 - 1084 GDRGETGAVGAPGAPGPPGSPGAPGPTGK
MSMS 404 891.880 2673.302 108996.000 3+ 121.181 55 46 26.800 1134 - 1163 GFTGLQQLPGPPGPGSGDQAGSAGPAGSPGR
von Willebrand factor A domain-containing protein 3A OS=Homo sapiens GN=VWA3A PE=2 SV=3 VWA3A_HUMAN
MKYRKISICCTAKRATPTSHVPHQENFLENCHIRNNYGRSKSLPQKQNMGLGQSNQNLVTVHVTODLLRLQSGESQSSDWEDESWLSAHSRLKQKLTADLLISQGTETVLEEGTNVVKICFSTQIIRHFE
KLSLSTIEVYGRDKIOWTEKNSPKAFGLKAGRVSLIDVSAISSGPKQKEFKDLMSLIDQLSHKEKLFVLVSGTNGSLWPDMPVEASTLQELKLVKTLQPDGSSNLQALKKIFITLKLGLDSLVAINRSCPDGP
SEILSDYQOSTMGDRDLITHTFYTRCDDQMPAVLKNLAEAVRGYHYCHYSPKMEHYTSRDMDELLAEIKQAQSLSHVQALQHSSPCEALCTMEEISTETITNGPLISLLPKPKKHDAPIITFEPMNLKTSNAELKVN
GLKAKLGLYVLAPNAPFSFVEEPFVILQKTVSSTIHEKAMIFQFEHWDQVKNIHVDPFPLYQQQLSARMMYERRIWLSSLASRHIGWVCEKRVVLLDISATNSMYIHIHQSLRLHLEQLSNKCRDNLIAF
GSTIESWPKFMPVSHNNLQSAWRMLNLRCRGSNNVLSALRKAVEVDFKDKDQSGQSYTLFTGGIDPCDMPPTLSAYMAEACGGCDQLNVCLFVPEKMPDPTTPARYASHDTDAAAKIEVTRAGRGPHFPGDTG
IYESDINSIEMEKALYQKCAFLMASLKHNSGVLGSSALPKKPKVTLQLRSGQPKLCPPTVPLTGARMSIKDDPREKSPPLKSLKWPPLSSVGLTSPAAAGPTKEQMWELRRKTSKREAFITSLLLYTEK
NDVGSYVKKYPQGRGLRRTSSSIDLPRKDTVCSSQEWVAKYGLKKLKLIESRCMGPNCTHQKSGQSASAKHCSITPSVSEIHGVVRIHQWTPREMEVYIRHLEKVLRRYVQRLQWLLSGSRRLFGTVLESKVCILLDT
SSGMGYPQQQVTEVLVLLIEWQLRKCCDSFNLLSFAESFQSQWDTLVETTDAACHEAMQWVTHLQAQGSSTISLQALLKAFSPHDLGLYLLTGKPDTSCLSLVNLVQKLEKREKROVKVHTISLNCSDRAAEVFLRKLKLA
SFTSGYHCFPGVEDLGLKISHLLTKGFINKEDPTLPFFGEGDLRLILAQETIKARSLFLWQAQSFRLQKKNDAEYKFTLS
MW:133934.570
Digest Matches (Score: 38.85)
Score = 38.850000, Rank = 4, Database = SwissProt, Accesskey = VWA3A_HUMAN
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence
MSMS 376 673.501 2018.004 110134.000 3+ 239.935 31 38 26.300 790 - 808 VGISPAAAOPTKEGMELR 15: Oxidation (M) 16: Oxidation (M)
TBC1 domain family member 22B OS=Homo sapiens GN=TBCE122B PE=1 SV=3 TB22B_HUMAN
MAENSKQFVKSAKLGSGIOPVYGAQPPDLPLRTKNFIKERSKVNTPVLKNNKSAFHEFARNTSDAWDIDGDEEDFSSPSFQTLNSKVALATAAQVLNHSKLRVKPERSQSTSDVPANYKVIKSSSSDAQLSR
NBSSTCLRNPLBQKQSLPLRIITPLVARISDQNASGAPMTVREKTRLEKFRQLLSQMTDLDELRCKSWPGVPREVRITWRLLSGYLPANTERRKLTQRKREYFPGIEQYIDSRNEEHQDQTYRQIHIDIRPTN
FLFLPQQLVQIEFEXRLFIWATRHPASQVVGINDLVTFVVFVLESEVEDVENFDTNLSQDHLRSIADSFWMKSLLDGIDQNTTFAQGPQKRVKALEELVSRIDEQVNMHFRRYVEYVQLQAFARMNNLL
NRELLRLCTILRLWYDGLKSHLVCYAFILIKWREILDEDEDFQKLLMLLQMLPTIRHWNESIGLLAEAYKLTWYFADAFNSTR
MW:59044.190
Digest Matches (Score: 33.08)
Score = 33.080000, Rank = 5, Database = SwissProt, Accesskey = TB22B_HUMAN
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence
MSMS 379 601.094 1800.891 88285.000 3+ 209.234 31 23 26.300 167 - 183 ISDQNASGAPMTVREK
MSMS 327 606.366 1816.886 233235.000 3+ 108.861 22 23 25.400 167 - 183 ISDQNASGAPMTVREK 12: Oxidation (M)
MSMS 332 909.058 1816.886 168223.000 2+ 122.780 30 9 25.500 167 - 183 ISDQNASGAPMTVREK 12: Oxidation (M)
MSMS 360 606.428 1816.886 233235.000 3+ 211.291 24 33 26.000 167 - 183 ISDQNASGAPMTVREK 12: Oxidation (M)
RNA-binding protein 47 OS=Homo sapiens GN=RBM47 PE=1 SV=2 RBM47_HUMAN
MTADESTAAMSSDSAAQSAKVPGEVAGAFNEAALLAMERTGYSMVQENQGRKYGPPGPGWEGPHPGQRCGEVVGKIPRDVYEDELVPVFEAVGRIYELRLMMDFGKNGRYAFVMYCHKHEAKRAVRELNNYIEIP
GRLLGVCCSVNCKRFLIGGIPKMKREEILIEIAKVTEQVLVDIVYASADAKMNRGFAFVEYESHRAAAMARRKLMPGRIQLWGHQIADVDAEPEIDVDEDMETVKILYVRNLMETTEDTIKSPGQFNPGCOVER
VKIRIDYAFVPHFSREDAVHANNLNGTELEGSCLVETLAKVPDKEQYSYQKAAARGGAGAAQQSIVYSYCDPYFLAYIYGYTHALIGPNRDYFVKAQSGIRGGRGAAGNRAQPRGSGYLGGSAGRGYSYRSHG
KGRQOEKVELVNLNLEIPTVNVVAKPGQVPAIAGIQVSMFFAPAAKPMIEDGKITHTVERHISPIAVQDPASAAAAAANAANAIVPTVSTPPFPQGRPIPTVTVVAPVQRIPTAGIYGASVYVPPAFAATYI
ATLQKNAANAAMYGAGYIQAQFAPAAIQQVPIPDVYTY
MW:64058.230
Digest Matches (Score: 30.85)
Score = 30.850000, Rank = 6, Database = SwissProt, Accesskey = RBM47_HUMAN
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence
MSMS 629 669.742 2007.812 50783.000 3+ -299.126 4 30 30.500 1 - 21 MTAEDSTAAMSSDSAAQSSAK 1: Oxidation (M) 10: Oxidation (M)
Ribonuclease P protein subunit p30 OS=Homo sapiens GN=RPP30 PE=1 SV=1 RPP30_HUMAN
MAVFDADLRAGSDLKALRGLVEYTAHLYGVSVVAINHIVDFKEXKQETKPPVASELPTLPIVQKGRIPKILITRITIVSDPSHCNVLRAATSSRARLYDVVAVPKTEKLFHIACTHLDVLDVLCITVTEKLPYVFK
RPPINVAIDRGLAFELVYSPAIKDSMTNRRYTISALLNLMLQICKGNVHISAAERPLEIRGPDVANLGLLFLGESDAAKAVSTNCRALLHGETRKTAFGIISTVKPRPSEGEDCPLASKKACKEG
MW:29302.680
Digest Matches (Score: 29.29)
Score = 29.290000, Rank = 7, Database = SwissProt, Accesskey = RPP30_HUMAN
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence
MSMS 173 605.365 1813.930 286090.000 3+ 63.059 17 23 22.600 167 - 181 RYTISALLNLMLQICK 11: Oxidation (M) 14: Carbamidomethyl (C)
Ankyrin repeat and FVYE domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=ANKFY1 PE=1 SV=2 ANKFY1_HUMAN
MAEEYVAKLEKHLMLRQYVYKIQKLAETEKRCALLAAQANKSSSEFSIRLLAIVADLYEQEYSDLIKVGDRHISAHKFLVLAARSDSHSLANLSSTKELDLSANPEVTMTLKIWIYTELEFREDDVFLITEL
MKLANRFGQLLREKCEKEVMSLVNVRNICRFYQTAELNASTLMNYCAEIIASHWDDLRKEDFSMSAQLLYKMIKSTETPLHKAIKVEREDVYVFLIEMDSQGLKLNEDAHNGDLADLDSLRRESIATTILV
SHKADVMVDKSGWSLHKGIRQDGLFAATFLIKNGAEVNAATLGAQETPLHLVALYSKKHSADVMSAQIAEALLQAGANPNMDDSKGRTPLVHSIMAGNEYVFSQLLQCKQLDLEKDHESGTALWAVQBITV
SDSQSVNPFEDVPPVNVNFDSEFSAABLIRQGSHTDAPDTATNGCLLQRAAGAGNEAALFLATNGAHVNRNKGWETPLTHACRGLANLTAELLQAGANPLQTEALPLPKEAASLTDSVGHQITPLHMAITA
YNNPDVSVILLEGANALATNNLQIITPDLSKDSRQTVLGLALTOHMTIAQILQSGAINDTMSDQTLHMAIQRODSKASPLLEHQAQIVNRVQDGETALQIARNLPLVVDATCTRDGAGVYDVEKGNP
PLWLLANNLDLLESTLVHRGCDATCWQPGQGLCTLLHRAITDENNETACPLIRSGCDVNSPRQGANEGEEREAQDQTPHLHAASWGLEETVQCLLEFGANVNAQDAGRTPIHVAISQSGHVIQLLVSHPIDI
HLNVRQGTPTFAACMTFKNNKSAEALIKRESGAQVDNKGKRNPLHVAQNDSIESVLFILSVHANVNSKVDQASKITPLHLAVQAGSEIIVRNLLLAGAKVNLTKHQRTALHLAAQQDLPTICSVLENGVFA
AVDENGNNALHLAVMHRGNINRIKVLTECTVDAEAFNLROGSPHLILQYQKNAEAAIFDLFLCNPMPGPDLPDADGTVLLLAVMKNGNANLCRAIVRSGARLVGNNGQVNIIFYVQVATKQLFRLLDMLSKPEFP
CDGSYCYECTARFGVYTRHHRCHRCGRILLCHCKSTEIPIIKFDLNRKPVRCNICFVDILTGGVS
MW:128318.100
Digest Matches (Score: 29.29)
Score = 29.290000, Rank = 7, Database = SwissProt, Accesskey = ANKFY1_HUMAN
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence



Spectrum Analysis Report

Date: 10/11/2011 Time: 13:45

FileName: H:\Bruker-II_F-disk\Stephie\081008\Beads+Biotin_BD1_01_1424.d\Beads+Biotin_BD1_01_1424.mgf

Score = 77.950000, Rank = 5, Database = SwissProt, Accesskey = RL31_BOVIN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06 , DB: SwissProt , DB Version: SwissProt_57.12.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 346.822.770 1644.925 19630198.000 2+ -238.465 1161 77 37.000 102 - 115 LYTLYTVYVPVTTFK

Tubulin alpha-1A chain OS=Cricetulus griseus GN=TUBA1A PE=2 SV=1 TBA1A_CRIGR

MRECIISIVHGQAGVIGNACWELCYLHGIIQPDGQMPSDRTIGGGDDSFNTFFSETGAGKHVPRAVFDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPQLITGKEDAANNYARGHYTIIGKEIIDLVLDRIKRLADQCTGLQGFLVF
HSFGGGTSGSFTSLIMERLSDVDYGGKSKLEFSIYPAPQVSTAVVEPYNSILTTHTTLEHSDCAPMVDNEATYICRRNLDIRPTTYNLNRLIQIVSSITASLRFDGALNVDLTEFQTNLVYPPRIHFPLATYAPVI
SAEKAYHEGLSVAETINACPEPANQMVKCDPRHGKYMACCLLYRGDVVPKDVNAAAIATIKTRTIQFVDWCPCTGFKVGINYQPPTVPVGGDLAKVQRAVCMLSNTTAAIEAWARLDHKFDLMYAKRAFPVHVYVGEGBME
EFGFSEAREDMAALEKDYEVGVDSVGEGBEEGEY

MW:50103.610

Digest Matches (Score: 74.54)

Score = 74.540000, Rank = 6, Database = SwissProt, Accesskey = TBA1A_CRIGR

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06 , DB: SwissProt , DB Version: SwissProt_57.12.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 435.190 909.504 4356608.000 2+ -144.493 19 21 22.100 157 - 164 LSDYGGKK

MSMS 340 851.260 1701.906 14827317.000 2+ -231.093 4144 74 36.500 65 - 79 AVFVDLEPTVIDEVR

40S ribosomal protein S8 OS=Bos taurus GN=RP58 PE=2 SV=3 RS8_BOVIN

MGISRDNNHKKRRRTGGKRRPYHKRRYELGRPAANTIKIGPRKIHTRVVRGGNKYRALRLDVGMPFSGWSECCRTKRIIDVVYNASNSELVTRTKLVKNKIVCLIDSTPYRWYESHYALPLGRKKGAKLTPEEEIILN
KRRKKIKQKDYDERKKNAKISSILEEPQGGKLLACTASRPQCGRADGYLGEKLEFYLKIKARRKK

MW:24190.160

Digest Matches (Score: 70.28)

Score = 70.280000, Rank = 7, Database = SwissProt, Accesskey = RS8_BOVIN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06 , DB: SwissProt , DB Version: SwissProt_57.12.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 250 859.730 1718.907 11258365.000 2+ -264.523 2048 70 32.500 78 - 92 IIDVVYNASNNELVR

60S ribosomal protein L18 OS=Bos taurus GN=RPL18 PE=2 SV=3 RL18_BOVIN

MGVDIHNKDKRRYKKEKPSQSLKLLLVKLIYFLARKRTFTFMQVQLRFLFMSRTNRPPLSLSRMIRKMKLPGREGKTAVVVGTTIDDVVRQVEPKKVCALRVSSRRSRRLKAGGKILTFDQLALDSPKCGCTVL
LSGPRKRGVYRNFEGKAPGTPTSHSTPYVRSGRRFERARGRASRGYN

MW:21522.020

Digest Matches (Score: 62.78)

Score = 62.780000, Rank = 8, Database = SwissProt, Accesskey = RL18_BOVIN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06 , DB: SwissProt , DB Version: SwissProt_57.12.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 315 730.700 1460.800 11559251.000 2+ -278.662 1061 62 35.400 120 - 132 ILTFDQALDPSK

MSMS 11 516.520 1547.808 1577263.000 3+ -169.569 43 23 19.700 155 - 168 APGTIPHSHTKTPYVR

40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Cercopithecus aethiops GN=RP54X PE=2 SV=3 RS4X_CERAE

MARGPKKILKRVAAPEKHHMLDKLVGPAAPSPSGPHLRLECLPLIIFLNRRLKALYALGDEGVKIKCQWRFIKIDGKRVTDITPYAGFMVDISIDKTGENFRLIYDTKGRFAVHRITPEEAHYKLCRKVKRIFVGTGKPIH
LVTHDARTIRYPDPLIKVNDTIQIDLETGKITDIFIKFTDGNLCMVTGANLGRIGVITNRERHPSGDFVVHVKDANGNSFATRLSNIFIVIGKGNPISLPRKGIRLITAEERDKRLAAQSSG

MW:29579.050

Digest Matches (Score: 60.32)

Score = 60.320000, Rank = 9, Database = SwissProt, Accesskey = RS4X_CERAE

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06 , DB: SwissProt , DB Version: SwissProt_57.12.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 162 368.610 736.424 12511125.000 2+ -287.237 13 17 27.700 169 - 174 ITDFIK

MSMS 366 943.190 1885.925 33167666.000 2+ -293.103 67 60 38.000 78 - 94 TDITYPAGFMDVISIDK

Nucleophosmin OS=Bos taurus GN=NPM1 PE=2 SV=1 NPM_BOVIN

MDESDMDMSPLRPQNYLFGCELKADRDYHFVKVNDNEHQLSLRTVSLGAGAKDELHVVEAEAMNYGSPPIKVTLATLKMSVQPTSLGGFEITPPVVLRLLKCGSGPVHISQHLVAVEADAEEEEEEVKLLSI
SGKRSAPGSGSKVPQKKVKLADEDEDDDDDDDDDDDDDDFDEVEEKAAPVKKSVRDTFAPNAQKSNQNGDKSKPSTPRSGQGESFKQEKTPKTPRGPSVEDIKAKMQASIEKGSLLPKVEAKFINVKNCF
RMTDQEAIQDQWRRKSL

MW:32682.870

Digest Matches (Score: 54.06)

Score = 54.060000, Rank = 10, Database = SwissProt, Accesskey = NPM_BOVIN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06 , DB: SwissProt , DB Version: SwissProt_57.12.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 55 466.180 931.473 6528261.000 2+ -129.367 273 52 22.800 240 - 248 GPSSVEDIK

MSMS 84 523.460 1568.730 11838260.000 3+ -232.483 4098 43 24.300 33 - 45 VDNDENEHQLSLR

Hepatoma-derived growth factor OS=Homo sapiens GN=HDGF PE=1 SV=1 HDGF_HUMAN

MSRSNRQKEYKCGDLVFAKMKGYPHWPARIDEMPEAAVRSSTANKYGVFFGTGTHETAFGLGPKDLPYVESKEFKGPKNKRKGFSEGLWEIENNPTVKASGYQSSKQSCVVEEPEPEPEAEAGDGGDKKNAEGSSDEEGK
LVIDEPFAKKEKGLKRRVLADEDEDDDDDDDDDDDDDDFDEVEEKAANTLEVERPLMHEVEKNSTPSPFGSGRGGPQEEEEDEEEAEATKEDAEAPGIRDHESL

MW:26771.870

Digest Matches (Score: 404.28)

Score = 404.276667, Rank = 1, Database = SwissProt, Accesskey = HDGF_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 1 423.650 846.494 5344708.000 2+ -238.565 16 21 16.500 73 - 79 FGKPNKR

MSMS 133 492.140 983.485 171058160.000 2+ -215.656 38 29 26.500 22 - 29 GYPHWPAR

MSMS 1351044.240 1044.521 34782796.000 1+ -269.057 42 26 26.500 158 - 167 AGDILLEDSPK

MSMS 125 522.630 1044.521 67133152.000 2+ -256.864 513 75 26.100 158 - 167 AGDILLEDSPK

MSMS 4 544.610 1088.497 8996087.000 2+ -261.117 73 23 17.700 198 - 208 NSTPSEPGSGR

MSMS 121 551.630 1102.545 196771456.000 2+ -265.206 155 44 25.900 30 - 39 IDEMPEAAVK

MSMS 3 566.100 1131.480 2089556.000 2+ -254.114 262 38 17.300 171 - 180 EAENPEGEEK

MSMS 87 600.670 1200.622 28724540.000 2+ -241.032 214 62 24.800 157 - 167 RAGDILLEDSPK

MSMS 177 692.630 1384.663 51872692.000 2+ -296.554 161 40 28.500 62 - 72 DLPFYEEKK

MSMS 302 910.200 1819.886 124578152.000 2+ -271.248 51 59 34.900 81 - 96 GFSEGLWEIENNPTVK

MSMS 475 910.210 1819.886 3354775.000 2+ -260.252 16 20 43.600 81 - 96 GFSEGLWEIENNPTVK

MSMS 262 649.810 1947.981 48056700.000 3+ -290.501 192 42 33.000 80 - 96 KGFSEGLWEIENNPTVK

MSMS 259 974.230 1947.981 87080608.000 2+ -271.355 16895 87 32.800 80 - 96 KGFSEGLWEIENNPTVK

MSMS 339 663.480 1988.991 41840340.000 3+ -284.252 84 46 36.500 45 - 61 YQVFFGTHETAFGLPK

MSMS 341 994.720 1988.991 35783508.000 2+ -280.592 284 96 36.600 45 - 61 YQVFFGTHETAFGLPK

MSMS 88 705.780 2115.902 11067562.000 3+ -272.733 18 33 23.600 106 - 125 KSCVEEPEPEAEAGDGDK

MSMS 166 761.110 3042.282 34413256.000 4+ -283.943 143 45 28.000 209 - 235 GPPQEEEEEEDEEEATKEDAEAPGIR

MSMS 1751014.490 3042.282 41009584.000 3+ -271.686 46 50 28.400 209 - 235 GPPQEEEEEEDEEEATKEDAEAPGIR

MSMS 1671014.820 3042.282 41009584.000 3+ 53.835 107 57 28.000 209 - 235 GPPQEEEEEEDEEEATKEDAEAPGIR

Nucleolin OS=Homo sapiens GN=NCL PE=1 SV=3 NACL_HUMAN

KVTLAKAKKQGDPPKMAFPPEVDEDEDEDEDEMSDEEEDDSGSEVYIPQKKKGAATAASAKGVVSPPTKVAWAPPAKKAATPPGKKAATPAKKTTPYAKAVTTPGKKAGPGKALVAPGKGAALPAGKAGNK
AKAKSD

Spectrum Analysis Report	
Date: 10/11/2011 Time: 13:45	
FileName: H:\Bruker-II_F-disk\Stephie\081008\Beads+Biotin_BD1_01_1424.d\Beads+Biotin_BD1_01_1424.mgf	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 384 631.200 631.352 16267176.000 1+ -241.408 6 7 38.900 136 - 141 NGKNAK	
MSMS 18 416.680 632.441 2387569.000 2+ -106.255 94 22 20.300 404 - 410 VTQDELK	
MSMS 21 442.720 884.556 3468160.000 2+ -139.936 46 29 20.700 117 - 125 ALVATPGKK	
MSMS 87 457.610 914.469 7656577.000 2+ -280.582 4 6 24.400 7 - 15 AGKNQGDPK	
MSMS 191 589.640 1178.569 15975798.000 2+ -251.405 272 80 29.100 411 - 420 EVFEDAAEIR	
MSMS 291 781.200 1561.681 20211610.000 2+ -184.418 1039 50 34.300 611 - 624 GFGVDFNSEEDAK	
MSMS 392 771.180 2312.156 15399852.000 3+ -272.720 143 47 39.200 298 - 318 VEGTEPTTAFNLFVGNLNFNK	
MSMS 406 771.600 2312.156 16341907.000 3+ 272.464 9 10 39.900 298 - 318 VEGTEPTTAFNLFVGNLNFNK	
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens GN=HNRNP1 PE=1 SV=5 ROA1_HUMAN	
MSKSESPKEPEQLRLPIFGLSFETTTDESLRSHFQWGTLTDCVVMRDPTKRSRGFGVTYATVEEVDAMNARPHKVDGRVVEPKRAVSREDSQRPAHLTVKKIIFVGGIKEDTEEHLRDYFQYKGIEVIEIMT	
DRGSGKKRGKAFVFTVDHDSVKIVIQYRVTVNGHNCEVRKALSKQEMASASSSQGRSGSGNFGGGRGGGFGGNDNFGRGGNFSGRGGFGSGRGGGYGGSGDGYNGFGNDGGYGGGGPGYSGSGRSGYGGQGYGN	
QSGGYGGSGSYDYNNGGGGGPGGGSGNFGGGGSYNDPQNNYNSNFGPMKGNFGGRSGSGPYGGGQYFAPKNRQGGYGGSSSSSYSGGRFF	
MW:38723.050	
Digest Matches (Score: 94.33)	
Score = 94.330000, Rank = 3, Database = SwissProt, Accesskey = ROA1_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 35 650.160 1299.654 2807928.000 2+ -262.703 44 36 21.700 4 - 14 SESPKPEQLR	
MSMS 30 719.200 1437.744 4555030.000 2+ -244.815 27 23 21.400 93 - 105 EDSQRPGAHLTVK	
MSMS 23 847.600 1694.700 1684028.000 2+ -299.568 32772 92 20.900 353 - 370 NQGGYGGSSSSSYSGSR	
40S ribosomal protein S15 OS=Homo sapiens GN=RPS15 PE=1 SV=2 RS15_HUMAN	
NABVEVQRKKRTFRKFTTFRGVLDQLQDMSYQLMQLYSARQRRLLNRGLRRKQBSLLKLRAKKEAPPMKEKPEVVKTLRDMILPEMVGSMGVYNGKTFNQVIEIKPEMIGHYLGFSITYKPKHGRPGIGATHS	
SRFTPLK	
MW:17029.170	
Digest Matches (Score: 81.67)	
Score = 81.670000, Rank = 4, Database = SwissProt, Accesskey = RS15_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 4201026.710 2053.017 11335481.000 2+ -294.314 810 81 40.700 82 - 100 DMILPEMVGSMGVYNGK	
60S ribosomal protein L31 OS=Homo sapiens GN=RPL31 PE=1 SV=1 RL31_HUMAN	
NAPAKGGEKKGRSAINEVVREYTIINIRKKHGVGFKRAAPALKEIRKFAKEMOTPDVRITDLNKAVWAKGINRVPYIRVRLSRKRNEDSDPNKLYTLVTYVPTTFKNLQTVNVDEN	
MW:14453.930	
Digest Matches (Score: 77.95)	
Score = 77.950000, Rank = 5, Database = SwissProt, Accesskey = RL31_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 346 822.770 1644.925 19630198.000 2+ -238.465 1161 77 37.000 102 - 115 LYTLYTVYPVITTFK	
Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A PE=1 SV=1 TBA1A_HUMAN	
NRECISIVHQAGVGIGNACWELCYLEHGIPQDGQMPSDKTIGGDDSFMTFFSETGAGKHVPRAVPVLDIPEITIDEVNTGTTRQLFHPPEQLITGKEDANNYARGHYTTGKEIIDLVLDRINKRLADQCTGQGLFLVF	
HSFGGOTSGFSLMERISVDYKSKLEFSITYPAQVSTAVVEVYNSILTHFTTLLEHSDCAFWDEAIIYDICRNLNIDERTFTTMLRLIGQIVSSITASLRPDGALNVOLTEPQNLVPVPRHFFLATYAPVI	
SAEKAYHEQLSVAETTNACFEPANQMVKCDPRHGKYNACCLLYRGVDVPRDVAALAITRTKRTIQFDVWCQGTGFKVGINQPTTVPVGGDLARQVRAVCMLSNTTATAEAWALDHKFDLMYAKRAFPVHWYVGEOME	
EGEFSAEAREDMALEKDYEEVGVDSVEGEEGEEGEY	
MW:50103.610	
Digest Matches (Score: 74.54)	
Score = 74.540000, Rank = 6, Database = SwissProt, Accesskey = TBA1A_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 43 455.190 909.504 4356608.000 2+ -144.493 19 21 22.100 157 - 164 LSDYQKK	
MSMS 340 851.260 1701.905 1482717.000 2+ -231.093 4144 74 36.500 65 - 79 AVFVQLEPTVIDEVR	
40S ribosomal protein S8 OS=Homo sapiens GN=RP58 PE=1 SV=2 RS8_HUMAN	
MGISRONWHKRRGTGKRRKPYHKRRKYLGRPAANTKIGPRIHTVVRVGNKKYRALRLDVGNFSGWSECCCTRKTIRIIVVYNASNELVVRTKLKNCIVLIDSTPYRQWYSHYALPLGRKKGAKLTPPEEEIIN	
KRRSKKIQKKYDERKKNNAKISLLEEQQQGLLACIASRPGQCRADQVLEGEKELEFYLRKKIKARKGK	
MW:24190.160	
Digest Matches (Score: 70.28)	
Score = 70.280000, Rank = 7, Database = SwissProt, Accesskey = RS8_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 250 859.730 1718.907 11258365.000 2+ -264.523 2048 70 32.500 78 - 92 IDVVYNASNNEVLVR	
Nucleophosmin OS=Homo sapiens GN=NPM1 PE=1 SV=2 NPM_HUMAN	
MEDSHMDMSPLRPQNTLFGCELKADKDYHFKVDNENEHQLSLRTVSLGAGAKDELHIVEAEAMNYEGSPIKVTLATLKMSVQPTVSLQGFETPPVVLRLKCGSGFPHISGQHLVAVEEDAEEDEEEDVKLLSI	
SGKRSAPGGSKVPQKVKVLLADEDDDDDDDEDDDDDDDDDEEAEAKAPVKKSIIDTPAKNAQKSNQNGKDSKPSSTPRSKQGESFKQKEPTKPTPKPGSSVEDIKAKMQASIEKGGLPKVEAKFIVNRYNCF	
RWTQDEATQDLWQWKKSL	
MW:32554.840	
Digest Matches (Score: 65.56)	
Score = 65.560000, Rank = 8, Database = SwissProt, Accesskey = NPM_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 55 466.180 931.473 6528261.000 2+ -129.367 273 52 22.800 240 - 248 GPSSVEDIK	
MSMS 84 523.460 1568.730 11838260.000 3+ -232.483 4098 43 24.300 33 - 45 VNDENEHQLSLR	
60S ribosomal protein L18 OS=Homo sapiens GN=RPL18 PE=1 SV=2 RL18_HUMAN	
NCVDIRHNKURVRRKEPKSDIYLRLLVLYRFLARKNSTFNVQVLLKLFMSKTRFPLSLSRMIRKMKLPGRENKTAVVVGITITDDVRVQVEVPLKVCALRVTSRARSRLIRAGGKILTFDQLALDSKPGCQOTVL	
LSGPRKGRVYRHPKAPQTPHSHTKPYVRSGRKFRARGRARRSGTKVM	
MW:21621.070	
Digest Matches (Score: 62.78)	
Score = 62.780000, Rank = 9, Database = SwissProt, Accesskey = RL18_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 100 813.250 813.458 18761130.000 1+ -255.646 9 1 25.000 72 - 78 LPGRENK	
MSMS 315 730.700 1460.800 11559251.000 2+ -278.662 1061 62 35.400 120 - 132 ILTFDQLALDSPK	
MSMS 11 516.520 1547.808 1577263.000 3+ -169.569 43 23 19.700 155 - 168 APGTPHSHATKPYVR	
40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Homo sapiens GN=RP54X PE=1 SV=2 RS4X_HUMAN	
NARGPKKHLKRVAAKPHWMLDKLTGVFAPRFTGPHKLRECLPLIIFLRNRLKVALTGDEVKKICMQRFIKIDGKVRTDITYPAGFMDVISIDKTGENFRLIYDTKGRFAVHRITPEEAQYKLVKVRKIFVQTKGPIH	
LVTDHARTIRYFDPDLIKVNDITQDLETKGITDFTKFDGNCVMVGGANLGRIGVITNRERHPSGFDVVHVKDANGSFATRLSNIFIVIGKNKPWISLPRKGIRLITAEERDKRLAAKQSSG	
MW:29579.050	
Digest Matches (Score: 60.32)	
Score = 60.320000, Rank = 10, Database = SwissProt, Accesskey = RS4X_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 162 368.610 736.424 12511125.000 2+ -287.237 13 17 27.700 169 - 174 ITDFIK	
MSMS 366 943.190 1885.925 33167666.000 2+ -293.103 67 60 38.000 78 - 94 TDITYPAGFMDVISIDK	
 BioTools Version 3.1	
Copyright © 1999-2007 Bruker Daltonik GmbH	
Page -3-	

Spectrum Analysis Report	
Date: 10/11/2011 Time: 13:45	
FileName: H:\Bruker-II_F-disk\Stephie\081008\Beads+Biotin_BD1_01_1424.d\Beads+Biotin_BD1_01_1424.mgf	
40S ribosomal protein S3 OS=Homo sapiens GN=RP53 PE=1 SV=2 RS3_HUMAN	
MAVQISKKRKKFVADGIFPAELNEFLTRLEADGYSQGEVVRVTPTRTEIIILATRTQNVLGEGKRRIRELTAVVQKRFGFPEGSVELYAEKATVTRLCAIAQAESRLYKLLGGLVRRACYGVLFIMESGAGKCEVVV SGKLRQGRKSMKFDVGLMTHSGDPVNYVYDVAVRHVLRLQGVLGIVKRIMLFDWPTGIKIGKPKLPDHSVIVPEKDEILPTTFISBQGGKGFPEPPAMPQPVPTA	
MW:26671.430	
Digest Matches (Score: 54.43)	
Score = 54.430000, Rank = 11, Database = SwissProt, Accesskey = RS3_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Erz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 206 735.700 1470.769 13596297.000 2+ -255.738 28 40 29.700 215 - 227 DELIPTTPISEQK	
MSMS 171 787.270 1573.804 14193162.000 2+ -172.663 1037 45 28.200 228 - 243 GKGPEPPAMPQPVPTA	
60S ribosomal protein L9 OS=Homo sapiens GN=RPL9 PE=1 SV=1 RL9_HUMAN	
MKTILSNQVTDIPENVDTILRGFTVIVKPGRTGLRDFNHNIVELSSLLGKKKKRLRVDKWMKNRELATVRTCISHVQNMKIGVTLGFYKMRSSVYAHFFPINNVIQENGSLVEIRNPLGEKYIRRVMRPGVACSVSQ WQRVLELLEGNDIELVSNSSAIIQQAATTVKNKDIRKFLDGIYVSEKGTVQQADE	
MW:21849.800	
Digest Matches (Score: 48.35)	
Score = 48.350000, Rank = 12, Database = SwissProt, Accesskey = RL9_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Erz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 51 426.230 851.535 6442779.000 2+ -96.629 7 10 22.500 12 - 20 VAPAPAVVK	
MSMS 193 606.650 1216.632 15591463.000 2+ -279.147 533 38 29.200 38 - 48 NFGIGGDIQPK	
RING finger protein 213 OS=Homo sapiens GN=RFN213 PE=1 SV=2 RN213_HUMAN	
MVCDDGWEHCYLPASFSQHKVFVTPQAPLEAIAQYLAGHYRVPKQTLISAAAVFNDRCLCVIGASERAGVGKSLVYKRLHDKMKMLNVKNVPLKTIIRLIDPQVDSESRVGLLAPFLDLAQYQKVPVFLHLDVTSVSQGTG IIVWFLPKLLILQLVLMIDNGMKMLRNCHLYIVEILERRTSVPSRSSSALRTRVPQFSFLDIPFKVTICRPPKEVIDIMELSLALRSDETPGMDLWFCQSETFORQYQYLRRFNQNDLDTQYQEGSGVEGTPEECLEHQLHF HCGVIMPSSWELRNARFARLNYQLRDCASLFCNPSFIDGTLRGPKKFVVTFMIFMARDPATPSLHTSDSGFGRHMVMDGVRREDLAPFSLRKRWESEPHVPVFNDDHTTMTFIFGHLQPNINGSVDIAISHLTKGVI KRDVWRDLRYGLLLQKRVFNVDFDRILPRLHLELRLCLTGLIGPQATPDPKRYTELPTDNHAKLILKEMRRCGIPVITWEGTCOCQKTRILKFLSOLRRAGGTNADTILKLVYBGCTADMTISVYRBAENVAFAMKDQHQ LDTLLFDEANTYTAISCIIEKVCVLDHNVGQPLAEDSGLHIIAKONPYRRSESEWICRLSRLAGGLGVRSMEETADRLGSPLRQLVYRVHMLPSLILPLVWDPQGLSQVAEKLYIQTVQRLVESISLDEMGTVTTE VLCASQGFMRKTEDECSFVNSLDVRCEKVRVWRPFHESAMLLAQILNAFLSKSSVSKNHTERDPVLSMLAIGCVCHYASLEKDDSVRKAIARFPFKPYDDSRILLDDEITRAQDPLFDQVPLAKTIAKNLALKENVPM VVCIELKILPLVGVPGSSSKLAKTIVADAMQGPAAVSDLFRLSKQVHLVSFQCSPHSTPQGIISTPFRQCARQQGKDLQQYVSVVVLDEVGLAEDSPKMLKTLHLPLEDGCIEDDPAPHKVGVFGVISNMLADPAK MNRIQIPVSRGSPMETLEISAGKICSSDILVODRVQGYFASFAKAYETVCKRQKREFPLGRDYDYSILKIMVFAAAKASNRKPSQDIAQAVLRNFSGKDDIQALDIFLANLPEAKCESEVSPMQLIKONTIFGPSQKVP GQDDADESRVLYLVTKNVALQILQYTFPEGDQQPEIIFGSGFPDQDEYTLQCRNINRVKICMCTGKRVLLMLQNLYESLYDALNQYTVHLOGQKTYVDLGLGTHRVKCRVHPNFRLLIYIEKDDVVYKFFIPLINRL EKLHLDINTVLEKWSQIVBELCAWKEKPIVNAKHHQKHHYVSQDPIGYSDACASVLTQVIERQPPALTEELHQRVSEAKSILLNCKTPDAVRLSAYSLGCFEAEMLSQBYVQRHNSFADPQAHLRTA DLERHAIFPTETITTSRGLTSHDCEILSESVTGRAPKPTLLWLQQDFTEYSFLKEVRNCLNTAKCEKILIPQDFDEGIRSAQILIASAKYRSVINEINKIRENEDRIVYFVITIKLSRVGRGTAYGVFGHGLWQSVHIDDL RRSTLMVSDVTRLQHVTSIQLPFADGDLPELGEHRAEDGHEEAMETEASTSGEVAEVAEAMETESSEVKSEKTESSELGQSDVSILOTTLRLLRSQVQAVGMLDRQNESECTNRNRVLLGLLNEDDACHASFLRVSK MRLSVYKRLSSORGMFVQGLSKPQRPHQWVPKDVVKQGLRQDPHQMDRYLVVGDEYKALRDAVAKAVECKPLGKIKTALKACKTPQSQSAYFLLTLFREVAIILYSHSNASLHPTPEQCAVSFKIEGCKLIS LWVQAYITDABGLPKRFVDFIQPTFLGRFLAQLAGEPQQLLQCTLKDFILLTMNRVSTEEELKFLQMALNSCTRKLKAASEAPPEEVSLLPMWHLAYQRFPSRLQNPSILITIPYQVHLSMEARNHLEACCMFTLD AFANACTEMITRWLKPQNALQLVKNLSPLELICSDEHMGSSGLAQAIVREARQWSRIFETALPVEVVLGTESRVPELQGLVTEHFLDKCLRENSDVKTIGPFEANWTLCEKTESASTLTSRFGIOPC SICLDGARDPVCPLPCDHBVCLRLRANFASQMICPYCLTALPDEFSFAVSQAHRAEIKERHARFQMCNSSFVLDIVSTICFKDNAPPEKEVIESLLSLLFVQGRGLRDAQRCEHTKLSLSPFNDDVKTPIVRSVIL KLLKYSFHDVQYIYQELVTLKKKAFITEDKTLEYMLFINCLEDSELEKTSAYSARNDELNLHEEGRFLKAYSASRGRPEANEAESVEYLQEVARILCLDRAADFLSEPEGGFEMAKEQCYLQVQKQCIRVEND MRLSVYKRLSSORGMFVQGLSKPQRPHQWVPKDVVKQGLRQDPHQMDRYLVVGDEYKALRDAVAKAVECKPLGKIKTALKACKTPQSQSAYFLLTLFREVAIILYSHSNASLHPTPEQCAVSFKIEGCKLIS PDIISFAPTSLVDSNVFLRAGPSDSINDGVTETMAIHAAAVLLCQONLELLEPLKNLAFSPATMAHAFPTMPEDLLAQARHWRKGLERVHHVYTCPNGHPCSVGEGCGRPEQSIICIDCHAPIGGIDHKKPDGPHVLVDKQ ADRYQYCHVLGNPQRDDVTCORLFPVFTLIRLLTHLALLGASQSQALNIIKPPYDPKGFQGHILKDLQGLAKMLGHSADPTICVTHVLIRLLQGLSSRLANFTPTELTETMRNNEKEIAVATISF QLEHLKDTLPMNLNIIISQKRISSNFVAKIYIGDPVTFLPHLPRKSVVHCKSIWSCRRTIYVEIQHIVYQKNGKERVPLWHHFLQKAEALRLVKFLPELIALQRDLSEKRLANFTPTELTETMRNNEKEIAVATISF HNRTVFLFSTWNKLRRSLTENGEINLPKDYCSTDLDDTEFFLILPFRRLGGLCATALVSYLIRLHNEIVAVAEKLSKENNSYSVDAAEVTEHLHVISYEVEYREDTFLILSNQCYQVEGREGTVOQFDELEKIQRIQVSR VLEQKPLRSLGKIPLVLYRHDWNYHFLMDIKNKMAQDSLPSVISAISGOLQSYSDACEVLSVEVTEGLFSTAGGDPMQLNVTQDILQMGDQTHVLKALNRCLKHTIALWQFLSAHKSQGLRLKHEKPEPGEI SSRYKADLSPENAKLSTFTLNQGLDAFLELHEMIILKLNKPNQYQTEERRFPQWSLRDTLVSYMQTKSEILIPENASQFPEEILLASCVSVMKTAAVLKWNRMR	
MW:373741.600	
Digest Matches (Score: 47.94)	
Score = 47.940000, Rank = 14, Database = SwissProt, Accesskey = RN213_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Erz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 206 735.700 1470.791 13596297.000 2+ -271.006 62 47 29.700 214 - 292 RSLETNGEINLPK	
MSMS 413 793.960 2379.168 11750121.000 3+ 293.158 4 8 40.200 1081 - 1101 CSEEVSPMQLIKQNIFGPSOK 8: Oxidation (M)	
TRANSLATION INITIATION FACTOR EIF-2B SUBUNIT EPSILON OS=HOMO SAPIENS GN=EIF2B5 PE=1 SV=3 EIF2B_HUMAN	
MAAPVVFAPGVGVSSAMNRSGAGPGSGGGGARGAEPEPPPLQAVLVADSPRRFPFVTSKDPQVRLPLLANVALIDYTFLEFLATQVQETPVFCCKAAQIKHELLKSKWCRPTSLNVVRIITSELYRSGLDGLRDV DAKALVRSDFPLLYGVDSINITRALEHRLARKLKRKSVVMTHFKESSPSHPKCHDEDAVADSTVNRVHLKQQLRAPPFLPLQSSQSGVVEVRDLDCHISICSPQVAGLPDFNFDYQDPRFVGL LVNBEILGNQIHMSPVTEKYGARVSNLBMYSACVADVIRRWVYLPTEANPTDSTQSGTSHRNNIYRGPEVLSGHGSIILEENVLGSQTVIGSNCFPTNSVIGQKTPGDNVLDQTYLMQGVRAAAGIIBQSLC DNAEYKERVETLKPRLSVLTSQVVVGNPNTLPGSVSILSHPPDAEEDDEDDGFSDDSGADQEKVKVMKGYNPAEVAAGKGYLWKAAGNMEEEEEQNLWGLINMEESESSESGMSDEPDSRGSGPQMDIKV FQNEVLOTQGRKEENISCDNLVLEINSLKYAINISLKEVMQVLSHVVLFFPLQOMDSPLDSSRYCALLPLLKAWSPVFRNYIKRAADHEALAAIEDFFLEHEALGISMAKVLMAFYQLEILAEZETILSWFSQDRT TDKGQQLKRNQQLQRFIQWLEKEAEESSEDD	
Digest Matches (Score: 47.37)	
Score = 47.370000, Rank = 15, Database = SwissProt, Accesskey = EIF2B_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Erz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 97 600.670 1200.583 28724540.000 2+ -208.502 34 47 24.800 19 - 33 RSGAGPGSGGGGGAR	
MSMS 400 925.670 2774.447 15538931.000 3+ 197.699 11 9 39.600 146 - 169 SDFLLVYGDVISNINITRALEHR	
Dynein heavy chain 1, axonemal OS=Homo sapiens GN=DNAH1 PE=1 SV=4 DYH1_HUMAN	
MEQPNKSGYSLGRTPQGEPCSSAPAVQVQTHRGLEYNPGKILPGSDYGLGNPFPALDPKPLPHLPLPAPPPTLSLQDQPKRSPILTQDKKYPLMKORGFYSILSPOTLDQLEVCRCGRPMNSQNLRLQADLDKFTPRVGS FEVDFQERMEQDCTGSTRLLAQDFPLQATPEKMWVFPVLPQGRKATIEKRRKQVSLDIEGQLLSSQGISDNKMLPMDHLPQGHQPTTPEGHQPFPYIPLKVFQNDQCKPTREWINMKLEPGLSRKPV PGKALLPTDDFLGHDPGSGKLYKWCQGVLDYDEKRLYLVKDEKGLVRDEMRPLINAGQVTEGRRPQVQCTNVPRIQLLFCAEDPCPCFAGRVVQNALAKNTEALLYLIVDCMPSDGGHYISQGLSKY KQNALSTPMRSLKGSVLHELSLAREVSLDYERSMNKINFHDVSSKPTFTSYVTLRKKEEQVEPRGLVSVPKHWEQKEDFTFVSLLTRPEVITALSKVRAEKNKVTAMSLPHSSLSKYSHLEFEQIQSTFSQ VQMLFDSWISSLSKLVMSDSLDMSSKGNWLYETNWEVYLSMKLRKMLVELKMYLQDTLRFVLQDLSASFQPSIDTCCSVLNTCDMDVWGDDLINSYPRPKNPLPIMDLVDSGHVSTPLQFEASLNLFLDKG IQATHAVPQKLEWVDFIISGDPILLESVGLHEPLVEELRATIASAVSKAMIPLOAYAKEYRKYLENNNDIASFLKTYQTOGLLAQEVREVVLTHLREKEILDSSLPSSIIIGPFYINTDNVQSLSKKKKALATS LDILAKNLKREVDICEEFPISIRRIYKPNSTIELAELEWMMGKPERKVLGLEERIVKMYDDQVWDEFLYNLSSDPDNKMIASNWPSKILQGLIELVQQHVEDEEKFRIIQIMQDNQFQEKLEGLLVAGFSIH VEISRAHEIANVRVVKLQKQDQGLAMLYNNRKEIFSLPTWYDLSRWKEFPQYLDLWTSADSLRWSEWNNPLSADAEGLKENVVEAFTHMHCYQKPKMPAQCEVALDIRAIEEFPYIPLIQGLRNP GNRIIRWETLSGQININVRPKANLTFARCLEMNLQDHIESISKVAEAVAGEYAIIEQALDKMEKEWSTILFNVLPHYKATDYILKSPDEASQLLDHIVTMQMSFSFYKPEGRINSWENKLIKTOVELEWLNCR SWLLETPFSSDINQQLPVESKRQYTMERIKWKIMKNAYENREVINCSDLRMLDSLRDCKNILLDEVKGLSEYLETKRSAFPFRFYLSDDLELILSGTQKDPFATQPHRLKCFENIARLLQFDELEITIMYSAGE EVOLCFSPYSSINVEDMLREVERSMKASVHDIIEKAIKRAYTPMTQVWLNWPNQGVITAGCQTVMEVAEALAEAGNLRSOLFQQLQQLSDLVALVRGKLSMRQRAVLSALIVIEVHAKDVVSKLIQENVVSVDNQ WISGLRYWTFNDLRIYRAVAEPIGYEYLGNSGLVITPLTDKCTLLTGALHLKFGAGAPAGTGKTETTDGLKALALQTVVFNCSQDQDPHMGKFFRGLASAGAGACPFEPNRIIDEVLSVVAQIYITIQKA QQQVREPFVEVETPLPVSCAVFTPMNPQYAGRETLPONLKLKFPVAMWVYAMTETISLYSPGNEASVLAKTITPTFLSEBQLSSQDHPDMCAVRIYSAAGLAKRNPMSMELICLRAIDWNPVPL QEDSLKISGIVSLTIEEDTDGILDEAIREACRNSNLKDVGEFTLTKCIQVLETTVVRGMLMNVGTPSGKSGSTCYRVLAAMTSLKGQPSISGMYEAVNYVILNPKSITMGQLTGWDGIFSSFI AGATISDTNKNWYMPDGPVDAIENMNTVLDONKILCSSGEIKLTEAMTMFVEQDLAVASPAVTSRSCGMVLEPSILGLMFPTECWLRLPPLKPYEEHFKALPVSFLEESIFRVSVKEVIASTNCNLTMS LLKLLDCFPKFFPLRPEGLKPISEKLSRIVELIEPWFIFSLINSVQATQSSGRTFSHWLRKLMENBQTLTFPEEGLVPDYRLDAGISGTDNSEDEEEYKQVAVWKMSSAPPTMVDPDNYCNIIIVPTMDTVQ MSHLLDMLITNNKPVLCIGPTGTGKTLTISIKLNLALDYISHLFTTSARTSAMTQDPIFSLDKRRRGVPGPLGRNFIFFIDDLNPALETYGAQPPITELLRQWMDHGGVDRKIIGAFKNLVDINFCVAMPGP GGGNVTVPLMHHVPLISFAEMDEVSKRIFETILQNLIDLLQKSYRVEVQAPHIAHTEPLVEATLWYATTSQLLPFAKSHYFPLRDLRSVFQCMADRAVEQDQVOLLKALVHENCVRFLNVEE DRSWDFDGLKRCMEQEVTFNKVCFPQILYDGMFSGSDSGYFLETISESKMMQVIEYIEDNQININTAKLKLFLMDAMSHICRISRTLRLQALGNALLGLGVGSGRSSITRLASHMAEYCEQIELSKMNSSEWR	



Spectrum Analysis Report	
Date: 10/11/2011 Time: 13:41	
FileName: H:\Bruker-II_F-disk\Stephie\081008\Beads_direkt_BD2_01_1425.d\Beads_direkt_BD2_01_1425.mgf	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_57.12.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 58 643.260 643.377 17814850.000 1+ -182.678 177 7 21.400 81 - 87 AAVTPGK	
MSMS 247 940.300 940.514 25701318.000 1+ -227.590 64 14 30.000 432 - 439 GIAMIEFK	
MSMS 163 500.700 1000.542 38655860.000 2+ -149.534 161 32 28.400 336 - 344 NDLAADVDR	
MSMS 301 825.110 1648.738 47637288.000 2+ 288.290 259 28 32.500 351 - 364 FGYYDFESAEDLEK	
MSMS 4311250.800 2501.302 12715822.000 2+ -283.713 183 107 38.400 488 - 509 TLVLSNLSYSATKETLEEVEFK	
MSMS 433 834.220 2501.302 24977540.000 3+ -262.626 99 73 38.500 488 - 509 TLVLSNLSYSATKETLEEVEFK	
60S ribosomal protein L18 OS=Bos taurus GN=RPL18 PE=2 SV=3 RL18_BOVIN	
NCVDTLHHKDRVRKPEKPSODITLRLVLRVFLARRNTFTFNOVLRLKFLMSKTRRPPLSLSRMIRKMKLPGREGKTAVVVGTTDDVVRVQVPEPKVLCALVSSRRARSRLKAGGKILTFDQLALDSPKGCOTVL	
LSCPRKGEVYRHRFGKAPGTPHSHTPKPVRSRGRKFERAGRRASRGYKN	
MW:21522.020	
Digest Matches (Score: 103.85)	
Score = 103.850000, Rank = 5, Database = SwissProt, Accesskey = RL18_BOVIN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_57.12.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 318 730.770 1460.800 38062296.000 2+ -182.758 1061 103 33.300 120 - 132 ILTFDQLALDSPK	
MSMS 14 516.490 1547.808 5027469.000 3+ -227.753 133 34 18 100 155 - 168 AGTPHSHHTKPYVR	
Nucleophosmin OS=Bos taurus GN=NPM1 PE=2 SV=1 NPM_BOVIN	
MDSNDMDMSFLRPQNYLPCGELKADRDYHFKVNDENEHQLSLRTVSLGAGAKDELHVVEAEAMNYEGSPITKVTLATLKMSVQPTVSLGGFEITPPVVLRLKCGSGFPVHISGQHLVAVEEDAEESEEEEEVKLLSI	
SGKRSAPGSGSKVPQKVKRLADEDEDDDDDDDDDDDDDDPDEEVEEKAPVKKSVRDTPAKNAQKSNQNGKSKFSTPRSKQGESFKQEKTPTRGRPSVEDIKAKMQASIEKGSLPKVEAKFINFYKNCF	
RMTDQEAIDQLWQWKRL	
MW:32682.870	
Digest Matches (Score: 102.65)	
Score = 102.653333, Rank = 6, Database = SwissProt, Accesskey = NPM_BOVIN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_57.12.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 82 784.640 1568.730 27053394.000 2+ -291.629 137 41 22.500 33 - 45 VQNDENEHQLSLR	
MSMS 390 910.160 1819.843 22168550.000 2+ -291.648 579 65 36.500 278 - 291 MTDOEAIDQLWQWR	
MSMS 3931113.830 2227.216 19838260.000 2+ -252.808 217 80 36.600 81 - 101 MSVQPTVSLGGFEITPPVVLRL	
MSMS 403 742.900 2227.216 35233100.000 3+ -238.109 12 12 37.000 81 - 101 MSVQPTVSLGGFEITPPVVLRL	
40S ribosomal protein S15 OS=Bos taurus GN=RPS15 PE=2 SV=3 RS15_BOVIN	
NAEVBQKKKTKFRKTTTRGVLDQLLDMSTYQLWQLTSARQRRLLNRGLRRKQBSLLKRLRAKKADAPPEKKEPVVTKLRLMDIILPEMVGSHGVYNGKTFWQVEIKPEMIGHYLGFEISITYPKVKGHRPGIGATHS	
SRFTPLK	
MW:17015.160	
Digest Matches (Score: 100.57)	
Score = 100.570000, Rank = 7, Database = SwissProt, Accesskey = RS15_BOVIN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_57.12.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 7 666.660 1332.688 2996823.000 2+ -281.773 52 24 16.500 128 - 140 HGRPGIGATHSSR	
MSMS 4381026.720 2053.017 24124628.000 2+ -284.568 2065 100 38.800 82 - 100 DMILPEMVGSMVGVYNGK	
MSMS 439 685.160 2053.017 16743706.000 3+ -279.707 25 13 38.800 82 - 100 DMILPEMVGSMVGVYNGK	
MSMS 492 863.340 2588.237 4568474.000 3+ -89.526 46 26 43.800 19 - 40 GVDLDQLLDMSYEQLMLQYSAR	
Histone H2B type 1-B OS=Homo sapiens GN=HIST1H2B PE=1 SV=2 H2B1B_HUMAN	
MEPSPSSAPAPKPKGSKKAITKAQKDGKRRKRSKESYSIVYVKVQVBPDTGSISSKAMGIMNSFVND1FERIAGEASRLAHYNNKRSTISREIQTAVRLLLPGLAKHAVSEGTKAVTKYTSST	
MW:13941.580	
Digest Matches (Score: 85.00)	
Score = 85.000000, Rank = 8, Database = SwissProt, Accesskey = H2B1B_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_57.12.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 422 872.170 1743.818 16789694.000 2+ -279.174 1170 85 38.100 50 - 73 AMGIMNSFVNDIFER	
60S ribosomal protein L6 OS=Bos taurus GN=RPL6 PE=2 SV=3 RL6_BOVIN	
MAGEKAEKPTDEKKEPKAKKADAGKAKKVKYKVKKGPKHCSRNPLVIRGIRYGRSAMYSRKALYKRYKSAKSKVEKKKKVRVLATVTKPVGGDKNGTRVVKLRKMPRYPTTEDVPRKLLSHGKKPFPSKHVRK	
LRASITPTGTLILLGRRHGKRVVFLKQLGSLLLVTGPLSLNVRPLRTRHQKFVIATSTKIDISGVKIPEHLTOTYFKKKLKRPHRQGEIFDTEREKYEITEQRKVDQKAVDSQILRKIAVPLQGLYLRVFA	
LNTGIYPHKLVF	
MW:32669.630	
Digest Matches (Score: 84.92)	
Score = 84.920000, Rank = 9, Database = SwissProt, Accesskey = RL6_BOVIN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_57.12.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 13 499.680 998.589 6057185.000 2+ -237.249 145 28 18.000 130 - 137 KPFSKHVR	
MSMS 458 763.290 1525.931 30073348.000 2+ -235.075 299 84 39.800 141 - 155 ASITPGTILILTGR	
MSMS 461 509.200 1525.931 10819308.000 3+ -226.731 329 33 40.000 141 - 155 ASITPGTILILTGR	
60S ribosomal protein L6 OS=Homo sapiens GN=RPL6 PE=1 SV=3 RL6_HUMAN	
MAGEKVEKPTDEKKEPKAKKADAGKVKKGNLKAKEKKGKPKHCSRNPLVIRGIRYGRSAMYSRKALYKRYKSAKSKVEKKKKVLATVTKPVGGDKNGTRVVKLRKMPRYPTTEDVPRKLLSHGKKPFPSQHVRL	
FLRASITPTGTLILLGRRHGKRVVFLKQLASGLLLVTGPLVLNVRPLRTRHQKFVIATSTKIDISNVKIPKRLHDYAPFKKKLKRPHRQGEIFDTEREKYEITEQRKIDQKAVDSQILPKIAVPLQGLYLRVFA	
LNTGIYPHKLVF	
MW:32707.630	
Digest Matches (Score: 84.92)	
Score = 84.920000, Rank = 9, Database = SwissProt, Accesskey = RL6_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_57.12.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 13 499.680 998.589 6057185.000 2+ -237.249 145 28 18.000 131 - 138 KPFSQHVR	
MSMS 458 763.290 1525.931 30073348.000 2+ -235.075 299 84 39.800 142 - 156 ASITPGTILILTGR	
MSMS 461 509.200 1525.931 10819308.000 3+ -226.731 329 33 40.000 142 - 156 ASITPGTILILTGR	
Hepatoma-derived growth factor OS=Homo sapiens GN=HDGF PE=1 SV=1 HDGF_HUMAN	
MRSNSNQEKYKCGDLVFARMKGYPHWPARIDEMPEAAVKSTANKYQVFFFTGHTAFLGPKDLFPYEEKPKGPNKRRGKGFSEGLWEIENNPVKASGYQSSQKKSKVEEPEPEEAABGDGKKGNABGSSDEEGK	
LVIDEPAKENENKGLAKRRAGDLSDSFKPKAEAFNPEGEKEAATLEVERLPLMEVEKNSTPSEPGSGRGGPPQEEEEDEDEEATDEADAEPGIDHESL	
MW:26771.870	
Digest Matches (Score: 554.06)	
Score = 554.058571, Rank = 1, Database = SwissProt, Accesskey = HDGF_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 134 492.130 983.485 115253448.000 2+ -236.013 35 30 25.100 22 - 29 GYPHWPAP	
MSMS 118 522.650 1044.521 115820824.000 2+ -218.532 641 65 24.500 158 - 167 AGDILLEDSPK	
MSMS 5 544.640 1088.497 28082308.000 2+ -205.944 18 19 16.100 198 - 208 NSTPSEPGSGR	
MSMS 56 559.630 1118.540 14857990.000 2+ -256.863 145 43 21.300 30 - 39 IDEMPEAAVK 4: Oxidation (M)	
MSMS 94 600.660 1200.622 90817992.000 2+ -257.704 1158 73 23.000 157 - 167 RAGDILLEDSPK	
MSMS 111 621.660 1242.620 51525212.000 2+ -247.512 285 52 24.000 20 - 29 MKGYPHWPAP	
MSMS 166 692.660 1384.663 247452368.000 2+ -253.191 260 53 26.600 62 - 72 DLFPHYEEKK	
MSMS 306 607.140 1819.886 63163552.000 3+ -264.252 68 13 32.800 81 - 96 GFSEGLWEIENNPVK	
MSMS 303 910.210 1819.886 172062512.000 2+ -260.252 100 51 32.600 81 - 96 GFSEGLWEIENNPVK	
MSMS 215 647.500 1941.000 35232140.000 3+ -265.084 45 14 28.500 181 - 197 EAATLEVERLPLMEVEK	
 BioTools Version 3.1	
Copyright © 1999-2007 Bruker Daltonik GmbH	
Page -2-	

Spectrum Analysis Report	
Date: 10/11/2011 Time: 13:41	
FileName: H:\Bruker-II_F-disk\Stephie\081008\Beads_direkt_BD2_01_1425.d\Beads_direkt_BD2_01_1425.mgf	
MSMS 3091061.890 3183.614 30630864.000 3+ 12.919 27 52 32.900 148 - 177 TTGVMDSGDGVHTVPIEYGALPHAILR	
60S ribosomal protein L6 OS=Homo sapiens GN=RPL6 PE=1 SV=3 RL6_HUMAN	
MAGEKVEKPPDTEKKKPEAKVVDAGGVKKGNLKAKKPKKGPHCSRNPVLVRGIGRYSBSAMYSRKAMYYKKRYSAAKSXVEKKKKKEVLATVTKFVGGDKNGGTRVVLRKMRPYRYTPTEDVRKLLSHGKKPFSQHVR	
KLASITPQITLLIITLGRGRKRVRVFLKQLASGLLLVTGVLNVRPLKRRHQFVIAITSTRIIDSNVKIPKHLTDAYFKKKLKRPHQEGEIFDTEKEKYEITEQRKIDQKAVDSQLPKIKAITPQLQGYLRSVFA	
LTNGIYPHKLVF	
MW:32707.630	
Digest Matches (Score: 88.86)	
Score = 88.860000, Rank = 8, Database = SwissProt, Accesskey = RL6_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 13 499.680 998.553 6057185.000 2+ -200.791 145 28 18.000 131 - 138 KPFSQHVR	
MSMS 458 763.290 1525.931 30073348.000 2+ -235.075 299 84 39.800 142 - 156 ASITPGTILILITGR	
MSMS 461 509.200 1525.931 10819308.000 3+ -226.731 329 33 40.000 142 - 156 ASITPGTILILITGR	
Histone H2B type 1-B OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BB PE=1 SV=2 H2B1B_HUMAN	
MEPFSKSAAPAKGSKKATIKAAQKDGKRRKRSKESYSIYVYKVLQVHPDTGISSKAMIMNSFVNDIFERLAGEASRLAHYNNRRTITSREKIQTAVRLLLPGLAKHAVSEGTAVTKTYTSK	
MW:13941.580	
Digest Matches (Score: 85.00)	
Score = 85.000000, Rank = 9, Database = SwissProt, Accesskey = H2B1B_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 422 872.170 1743.819 18796694.000 2+ -279.174 170 85 38.100 59 - 73 AMGINNSFVNDIFER	
Beta-actin-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=ACTBL2 PE=1 SV=2 ACTBL_HUMAN	
MTDELNALVVDVNGSGCMKAGFGDDDAFVAFPSMIGRPHQGVVMVGQKDCYVGDQAQSKRGVLTLYKPIEHGGVTVNDDMEKIWHYTFYNELRVAPDEHPILLTEAPLNPKINREKMTQIMFEAFNTPAMYVAIQ	
AVLSLYASGRITTIIVMDSGDGVTHVPIYIEGYALPHAILLRLDLAQRDLTDYLMKILTERGYNFTTTAREIRIVRDVKELICYVALDFQEMVRAAASSSPERSYELPDQGVITIGNERFCPEAIPQPSFLGIESSGIH	
ETTFNSIMKCDVIDRKLNTVNTVLSGGSTMYGIADRMQKEIITLAPSTMKIKIAPPERKYSVWVGSIILASLSTFQQMWISKQEYDEAGPIVHRKCF	
MW:41975.970	
Digest Matches (Score: 66.92)	
Score = 66.920000, Rank = 10, Database = SwissProt, Accesskey = ACTBL_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 32 462.180 923.567 4841700.000 2+ -232.526 28 37 19.900 330 - 337 IAPPERK	
MSMS 292 896.030 1790.892 26685374.000 2+ 89.849 103 60 32.000 240 - 255 SYELPDQGVITIGNER	
MSMS 350 933.020 2796.256 35677568.000 3+ 282.301 7 7 34.800 2 - 29 TDNELSALVVDNGSGMCKAGFGDDAPR	
Fibrillin-2 OS=Homo sapiens GN=FBN2 PE=1 SV=3 FBN2_HUMAN	
NGRRRLCLQIYPLMLQGVLLNAQGTAGQPPFPFKPPQPPPPQGVASATAGSGGGFLAPFYEREGAAVASRVRRRQGDVLRGPNVCGSRFHSYCCPGWKTLPGGNQCIVPICRNSCGDGFCSRPMNCTCSSQQIS	
STCSKSGQQCSFVRCMCHQIADDDHQCKQKQIITYGCGQPVCEMGQNGRCIGRWRCXCVGTPSPCEDEYRGSPCTQVYVNMQMGQGLGIVCTKTLCCATIGRAWHPECMCPAPQPCRRGFIPIWIRGAQGD	
VDEQAIPIGICQGGNCINTVSGFECRCRAGHQRSETTKCEDIDECISIPGICETGECGLSRSYFVCPRGYVTSIDGSRCIDORTCMCFSGLVNGRCAQELPGRMTKMQCCCEPQRGCMGIGTIPACPVRGSEYER	
RLCMDGLPMWGIPGASGRPGGTGGGFAFSPGNGNGYGGPGGTGFIPIPGGNGSFGVGGAGVGAGGQGP1ITGLTLTNGTIDICKHANLCLNGRCIPTVSRYRCENCMGYQDANGDCIDVDECTNSPCTNGDCVNT	
PGSYTCKCHAGFORTPTTKAQCIDIDECQGNVLCKNGRCVNTDGSFQICNAGFELTDTGKNVCVDHDECTTNNCLNGMGINEDGSFKCI CKPGFVLAPNGRYCTDVEDCQTGICMNGHCINSEGSFRCDPCPGGLAV	
GMDRGCVDFHMSRCTGGIKRGVCVRRFFGAVTSECCANPDYGFGEPCPCPAKNSAEFPHGLSCSGVGITVDGRDINECALDPDICANGICENLRGSYRCNCHSGYEPDASGRNICIDIDBLVNLRLDCNGLNCR	
TFGSVSCPCPQIVPTPTPEEDINECESNPVNGACNMLGSGFWDCSGPSKLSSTGLICIDISLKQTCWLIQDSRCEVNIINGATLKSCECATLGAANWSPERCELDIACPNGLARIKIVCEDENECEVFPVC	
RCRNVNSKSGSFHCECEPEGLTLDGTGRVCLDIRMQCYLKWDEDEICIHFPVQKFRMDACCACCAAGAAWGTCECECPKPTGEYETLCPRGAGFANRGDVLTRGPPFYDINECKAFPMGCTYGRKNTIGSKRCRNSGF	
ALMEDECRITIDECISPDLCSSGICVNTSPGFECCECFEGYESGFMMKNCMDIDECERNPLLCRGGTCTVNTGSPQDCPLGHELSRDEDCIDNECSLSDNLCKRNGKCVNMIITYQCCSNPGYQATPDQQGCTD	
IDECIMMNGGCDPQCTNSGSGYESCSSEGVALMPDGRSACIDECENNDPIDCGGQCTNIPGEYRCLCYDGFPMASMDMKTCTIDVNECDLNSNICMFGECENTKGSFICHQCLGYSVKGKTTGCTDVEDCEIGAHNCIM	
HASCILNIPSGFKSCSRBGWINGIKRILDLDCSGNTHQCSINAGCVNTPGSYRCACSEGTGDTGFTCSQVDECAENILICENGQCLVNPQAYRCCECMGFTPASDSRSQDIDECSPQNICVFGTCNNLPLGMFHICID	
DYELDRDNGCTDIDECADTNCVNLGICVNTPGRYECNCPDPQLNPDTGVGVNHRVGNCLFKPGRDGSLSCTWEIGVGSRSSCCSLGAWNPCECTCPVNSYTEITLPCQGGFGRPNPITLILEDIDECQE	
LPLCGQNGCINTFGSPGCECPQGYLLSEDTRICEDIDBCFARHPGVCGPQCTYNTLGNVTCIIPPEYVNGVGHNCMDMRKSFCEYRSYNGTCTCENELPNNVTKRMCOCCTVNVGKAWNKCEPCPTPTGADFKTCGNI	
PGFTFTDHTGKAVDIDECREIPGICANGVCINQIGSFRCCEPTGFSYNDLILVCEDIDECSSNGDNLQRNACDINSFGSYRCECAAGFKLSPNGACVDRNECLEIPNVCSHGLCVLDQSGSYQCTCHNGFASQDQTM	
MDVDECEHRHPCNGCTKNTVGSYNCLCPGFELTNNHNDCLIDECSSFGQVCRNGRCFNEIGSPKCLCNEGYELTPDGRKNCIDTNECVALLPGSCSPQTCNLEGSFRICPPPGYEVKSENCIDINECDEDPNICLEF	
SCTNTPGGFQCLCPGPFVLDSNGRRCFTDQSFCTTFNFGNCKCSVPKAFNTTAKKCCSKMPPGEGWDGCELCPKDDVEAFQDLCPYGHGTVPVPSLHTRDREVNCELESFGICSNQOCINTDGSFRCECPMGYNLDYTG	
VRCDTDECSINQNGNCTNVTIGSEFCMCKEGTFGPMHNCEDINECAQNLCLAFRCNWTFGYETCTCPITGALREDQKMKDOLDECBOLDCESRGMKCNLIGTFCICPPMARPDGEGVDNECECTK	
GICENRCVNIIGSYRCECNEGSGSSGTECLDRNQGLCFAPVLTQIQMASSSRNLVTKSECCDQGRGWGHQCLCLPQTAYKKICPHGPGVYTTDGRDIDECKVNPNLCTNQCINTMGSPRCCEKVKGYTDDI	
SOTSCIDIDECSSQSPKPCNYICKNTGEGSYQSCPRGYVLQEDGKTCOKLDECQTKQHNQCFQLVNTLGGFTCKPCPGTQHTACIDNNECQSQPSLCAQAKGICQNTPGSFSCQBRQFSLDAGLNCEDVEDCDGNH	
RCQHGQCNILGGYRGCCPGQGYIYQHWNQCVDENECSNPACGSASCYNTLGSYKACPSGFSFQDSSACHDVNECSSKNPCNYGCSNTEGGVLCGCPGYRVGGQGVSGMGFNKQYLLSLDTEVEENALSE	
ACEYCKINGYSKDRSKRSIHEDPPTAVEQISLESVMDSPVNMKFNLSHLGSKHEHILLRPAIQPLNNHIRVYISQNDNSVFRIHQRNGLSYLBTARKKLMPTGYTLEITSPLIYKKELKKLEESNEDDYLLGE	
LGEALMRRLQIQLY	
MW:314557.830	
Digest Matches (Score: 51.41)	
Score = 51.410000, Rank = 11, Database = SwissProt, Accesskey = FBN2_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 233 718.210 718.392 28455846.000 1+ -253.161 76 51 29.400 994 - 999 VCLDIR	
MSMS 399 738.090 1474.766 18891770.000 2+ 276.161 3 6 36.900 641 - 654 CICKPGFVLAPNGR	
MSMS 250 742.880 1484.629 21863194.000 2+ -186.245 22 5 30.100 2403 - 2416 NLVTKSECCDQGR	
MSMS 482 744.820 2231.966 14014918.000 3+ 214.701 3 6 41.900 2455 - 2473 VMPNLCTNGQCINTMGSF2 2: Oxidation (M) 6: Carbamidomethyl (C) 11: Carbamidomethyl (C) 15: Oxidation (M)	
MSMS 121 858.640 2573.985 40658072.000 3+ -30.805 5 10 24.700 845 - 867 TETETCEDINECSNPNVCNGACR 17: Carbamidomethyl (C)	
Histone H1.2 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1C PE=1 SV=2 H12_HUMAN	
NSEAPAPAAPAAPAKPAKPVKKAARKAGGTPRKASGPPVSELITKAAVAASKERSGVSLAALKALAAAGYDVKNNSRIKLGKLSLVSKGLTQVTKGTGASGSFKLNKKAASGEAKPKVKKAGGTGPKPKPVGAAKPK	
KAAAGGATPKRSAKTTPKAKRKAAPATVTKVAKSPKAKVAKPKAAKSAKAAKVPKAAKPKVVKPKAAAPKKK	
MW:21351.750	
Digest Matches (Score: 50.51)	
Score = 50.510000, Rank = 12, Database = SwissProt, Accesskey = H12_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 177 423.210 845.509 25214424.000 2+ -114.094 139 24 27.000 55 - 63 SGVSLAALK	
MSMS 142 663.700 1326.763 48742176.000 2+ -279.085 153 50 25.500 34 - 46 KASGPPVSELITK	
60S ribosomal protein L27 OS=Homo sapiens GN=RPL27 PE=1 SV=2 RL27_HUMAN	
MGKPMKPKGVLLVLAGYSGRKAVIVKIIDGTSRDPYSHALVADIGRYPKRVTAAMGKKKIAKRSKISKSFVKVYVNYNLMPTRYSVDIPLDKTVVKNQDVPDPALAKRKARREAKVFEERYTKGNNKVPQKLRFP	
MW:15787.750	
Digest Matches (Score: 50.48)	
Score = 50.480000, Rank = 13, Database = SwissProt, Accesskey = RL27_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 156 704.170 1407.684 33200910.000 2+ -249.549 267 50 26.100 74 - 84 VYNYNHLMPTR	
60S ribosomal protein L4 OS=Homo sapiens GN=RPL4 PE=1 SV=5 RL4_HUMAN	
NACARPLISVYSEKGESSGNVTLPVAFKAPRIPDIVNFBVNTLRKNNRQYAVSELAQHTSAESWGTGRAVARIPRVRGGGTHRSQGAFGNMCGRGRMPAPTKTWRWRHRRVNTTKRYAICSLAALASALPALVM	
SKGRIIEVPELPIVVDKRVGKTKKEAVLLKRLKAWNDIKVYASQRNRRAGKRRNRRIQRRQGIINYEDNGIIFAFRNIPGTILLNVSKNILLKLAQGGHVRFCITWESAFRRKIDELQWTRKAAASKN	
YNLPMHKNITNDLSRLIKSPEIQARLAPRKEIHRVVLKXNPLNLRILMLKLPYAKTWRNRNTILRQARNHKLVRDRAAAAAAALQASDEKAAVACKRPPVGGKGAAGVGVKQKFLVGGKAAATKPKPAPEKKFA	
EKKPTTEKKPKA	
MW:47667.430	
Digest Matches (Score: 48.09)	
Score = 48.090000, Rank = 14, Database = SwissProt, Accesskey = RL4_HUMAN	



Spectrum Analysis Report

Date: 10/11/2011 Time: 13:41

FileName: H:\Bruker-II_F-disk\Stephie\081008\Beads_direkt_BD2_01_1425.d\Beads_direkt_BD2_01_1425.mgf

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 11 432.140 863.485 3052608.000 2+ -245.679 131 48 17.800 240 - 248 LAPGGHVGHR

Histone H2A type 1-B/E OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AB PE=1 SV=2 H2A1B_HUMAN

MSGKRGQGGKRAAKATRSSRAGLQPTTVGRVHRLLRGNYSERVGAGAPVTLAAVLEYLTASTLELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAIRNDEELNKLGRVTIAQGQVLPNIQAVLLPKKTESHHKAKGK

MW:14126.950

Digest Matches (Score: 48.06)

Score = 48.060000, Rank = 15, Database = SwissProt, Accesskey = H2A1B_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 379 965.880 1931.169 4329908.000 2+ -215.568 46 48 36.000 101 - 119 VTIAQGGVLPNIQAVLLPK

Tubulin beta-2C chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2C PE=1 SV=1 TBB2C_HUMAN

MREIVHLQAGQCNGIQAQFWFVLSDEHGIDPTGTYYBGSDQLQLERINVTINEATGKYYVPAVILVDLEPGTMSVRSQPPQIIFPDPNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLVDVVRKAEESCDLQCFQLTHS

LGCGTGSQMGTLTISKIREEYDPRIMNTFSPVSPKVSQTVVPEYNATLSVHQLVENTDRTYCIDNEALYDICFRTLKLTPTTYGDLNHLVSATMSGVTTCLRFPGQLNADLRKLAVNMVPPRLHFFMPGFAPLTSR

GSQQYRALTVPELTQMQMFDKAKNMAACDPRHGRILTVAAVFRGRMSKMEVDEQMLNVQKNSSYFVEWIPNNVKTAVCDIPPRGLKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQPTAMFRKKAFLHWYTEGMEDEMEPTAESN

MNDLVSEYQQQDQATAEEEGEFEEAEVEEA

MW:49799.000

Digest Matches (Score: 47.45)

Score = 47.450000, Rank = 16, Database = SwissProt, Accesskey = TBB2C_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 235 660.210 1319.703 2868106.000 2+ -219.862 133 47 29.500 163 - 174 IMMTFSVVPSPFK

40S ribosomal protein S7 OS=Homo sapiens GN=RPS7 PE=1 SV=1 RS7_HUMAN

MFSSSAKIVKPNGEKPDFESGISQALLEEMNSDLKAQLRELNITAAKEIEVGGGRKAIIFVFPVQLKSFQKIQVRLVRELEKFKSGKHVVFIQAQRRLLPKTRKSRTKNKQKRPRTLTAVHDAILEDLVFPSE

IVGKRIVRLDGLSGRIKVLHDKAQNNVEHKVETPSGVYKKLTGKDVNFPEFPQL

MW:22113.260

Digest Matches (Score: 44.70)

Score = 44.700000, Rank = 17, Database = SwissProt, Accesskey = RS7_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 468 692.640 1384.642 21787928.000 2+ -266.863 133 24 40.500 184 - 194 DVNFEFFPEQL

MSMS 405 789.560 2367.281 26634846.000 3+ -259.970 29 44 37.100 121 - 142 TLTAVHDAILEDLVFPSEIVGK

40S ribosomal protein S17-like OS=Homo sapiens GN=RPS17L PE=3 SV=1 RS17L_HUMAN

MGRVRTKTVKAARVIIIEKYYTRLGNDPHTNKRVCIEAIIIPSKLRNKIAGYVTHLMKRIQRGFPVGRGISIKLQEEERERRDNVPEVSALDQEIIEIVDPDTKEMLKLLDPGSLNQLQVTPVGMNFKTPGRPV

MW:15540.390

Digest Matches (Score: 43.49)

Score = 43.490000, Rank = 18, Database = SwissProt, Accesskey = RS17L_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 22 601.160 1201.607 4982411.000 2+ -245.304 139 43 18.700 24 - 33 LGNDFHTNKR

ATAXIN-2-LIKE PROTEIN OS=HOMO SAPIENS GN=ATXN2L PE=1 SV=2 ATX2L_HUMAN

MLKQPFLQPPSQPPPTTQQAVARPPGGTSPNGLPGPLATSAAPPGPAAASPCLGVAAGSGLRRAEGILAPQPPPPQHQERPGAAAGSARGQSTGKGGPQSPVFEVYNNRMLHFLTAVVGSTCDVK

VKNQTTVBGLFKTLSSKFELAVDAVBRKASEPAGQPRREDIVDTMVFKPSDVMLVHFRNVDFNYATKDKFTD8A1AMNSKVNGEHEKVLQRWEGGDSNDDYDLESMSNGWDPNEMFKFNEENYGVKTTYDSSLS

YTVPLKXNSREPRRLRAQLARETSSPQTRLRIMENDGRTEEKBSAVORGSGREPSLASRGKXITPLPQVRREGPRGQVRCSSRGGRGPGLSLPPROPHLNDSSPGPGSEARCTINGSGRMSFPAQR

PLRGATLTSSPSNRSGTETVPPFAVGWRVPPRPSKAPAPATISASCEPPIQSAVPTSSASTPVTSVSDPGVGSISPASPIISLAPTDVRELSTKEPGRTLEPQELARIATKRVPLQNEQKRFQLEELRFPQAQ

KLQPSSTPENSLLDPPFPRILKEEPPGKEKEVDGLLTSEPMGSPVSSKTESVSDKEDKPLPLASGTEGCEPQPPPCPSQTGSPFVGLIKGEDKDEGPVAEQVKKSTLNPNAKENFNTKPLLSVNKSTSTPTSPGPRTH

STPSIPVLTAQSGSLYSPIYSYIPQIHMGPAVQAPQMPYPVNSVPGQQGKYRGAKGSLPQRSDDQHPASAPPMQAAAAAGPLVAATPYSSSYTPFNPQQFPQPMAMQPMARHPQDPVFAPMLQSNPRMLTSG

SHPQAISSSTPPGYSABQPTPQALYATVHQSYPHRATQLHAHQPOPATTPGSOPOSQHAAPSPVQHQAGQAPHLGSGOQONLHYHGAITOTPPSLPPGPSSQSSFPQPAAVYAIIHQQLPHGFTNMAHVTQA

HVQGTIAATAPPFHGAPHPQVMLHPPQSHGGPPQGAVPQSGVPALSASTPSYPYIGHPQGEQPGQAPGFPGGADDRREFSLAGGIWHGRAELQVGQDARVLGGE

MW:16050.530

Digest Matches (Score: 41.50)

Score = 41.500000, Rank = 19, Database = SwissProt, Accesskey = ATX2L_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 1 423.610 846.432 24869560.000 2+ -258.832 16 17 15.000 338 - 345 ESPSLASR

MSMS 94 600.660 1200.615 90817992.000 2+ -252.274 524 41 23.000 400 - 411 GINGGSPRMSPK

MSMS 265 674.460 2021.056 27886702.000 3+ 153.258 13 14 30.800 123 - 140 MLHFLTAVVGSTCDVKVK 1: Oxidation (M) 13: Carbamidomethyl (C)

40S ribosomal protein S19 OS=Homo sapiens GN=RPS19 PE=1 SV=2 RS19_HUMAN

HGVYTVKDVNQGEFVRLAALAFKKSGRLKVPFWDTVTLAKHKELAPYDENWFTYRAASTARHLILRGAGVGSMSTKIYGGRRQNGVMPSPHSRGSKSVAARVQLAEGLMHVKEDQDGGRLTPQGGQRLDRIAQGV

AAANKKH

MW:16050.530

Digest Matches (Score: 41.45)

Score = 41.450000, Rank = 20, Database = SwissProt, Accesskey = RS19_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 12 471.730 942.537 4676015.000 2+ -89.170 58 41 17.800 134 - 143 IAGQVAAANK

MSMS 196 563.740 1126.694 38010108.000 2+ -196.785 35 19 27.700 102 - 111 RVLQALEGLK



Spectrum Analysis Report

Date: 10/11/2011 Time: 13:38

FileName: H:\Bruker-II_F-disk\Stephie\081020\32Trypsin_BE1_01_1560.d\32Trypsin_BE1_01_1560.mgf

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence
MSMS 154 925.220 2774.432 2396936.000 3+ -283.555 29 69 29 100 62 - 94 LASVPAGGAIVASAAPGSAAPAGSAPAAAAEEK
40S ribosomal protein S10 OS=Homo sapiens GN=RP10 PE=1 SV=1 RS10_HUMAN
MLLPKXNRLAIVLELLEKEGVAKKDVHMFPELADKNVFNLRVHKMQSLKSRGVTEQFAWRHFYWLITNEGIQYLRDLHLPEIIVPATLRRSRPTEGRPPKGLGERPPARLTGGEADRDTRYRSVPPGADK
KAEGAGSATPEQFRGGFGGRGQPPQ

MW:18885.870

Digest Matches (Score: 62.35)

Score = 62.350000, Rank = 4, Database = SwissProt, Accesskey = RS10_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence
MSMS 400 555.200 1109.660 3063306.000 2+ -241.509 270 62 40 300 9 - 17 IAIYELLFK
Hepatoma-derived growth factor OS=Homo sapiens GN=HDGF PE=1 SV=1 HDGF_HUMAN
MSRSRQREYKCGDLVFAVMKGYPHMPARIDENPEAAVSGRTANKYQVFFPTGTHETAFLGKPLDFPTEESKEKFGPKMKRKGFSGLWEIENNPTVKASGYQSSQKKSCEVEPEPEAAEGDGGKKNABGSSDREGK
LVIDEPAKENKELKRRAGDLLEDSPKRPKEAENPEGEKEAATLEVERFLPMEVEKNSTPSEPGSGRGPPEEEEEDEEEATEDEAAEPGIRDHESL

MW:26771.870

Digest Matches (Score: 55.61)

Score = 55.610000, Rank = 5, Database = SwissProt, Accesskey = HDGF_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence
MSMS 202 564.110 1127.526 3735639.000 2+ -277.657 262 22 31 200 62 - 70 DLFPYEESK
MSMS 303 910.190 1189.886 13312491.000 2+ -282.244 53 55 35 900 81 - 96 FSEGLWEIENNPTVK
Methylcrotonyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MCC2 PE=1 SV=1 MCCB_HUMAN
MWLVRLRLRCARCAPRAYHGDSVASLGTQPDLSGALYQENYKQMKALVNQLHERVEHILGGGEKARALHISRGKLLPRERIDNLDIPGSPFLELSQFAGYQLYDNEEVPGGGIITGIGRVSGVECMIIANDA
TVKGGAYYPVTYVKQLRAQELAMQNRPCILYLVDSGGGALPRQADVPDRDRHGRTFTYMQAIMSSKNIAQIAVVMGSCTAGGAYVPAADENIIVRKQGTI FLAGPPLVKAATGEVSEAEIDGGADLHCRKSGVSDHW
ALDDHALLHLTRKVRNLYNQKLDVTEPSEEPFLPADELYGIVGANKRSFDPVEVIRIARIVDGRPTFEKAFYGDTLVTGFARIFGYPIVGIVNGNGLFSESAKQGTHFVQLCCQRNIFLLPLQNTGMFVNGREY
AEIACLDARWALVAACQVFKITLLIIIGSGYAGNYGHCGRATSPRLIYNFNARIIVMGGEGQAANVLATITKQDAREGKQFSSADEALKKEPIIKKFEEEGNPTYSARVWDDGIDIPADTRLVLGLSFSALNAE
TEKTDGCFIRM

MW:61294.410

Digest Matches (Score: 50.02)

Score = 50.020000, Rank = 6, Database = SwissProt, Accesskey = MCCB_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence
MSMS 493 967.070 1933.073 961879.000 2+ 31.017 260 50 44 700 395 - 411 NIPLFLQNTGFMVGR
Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PCCB PE=1 SV=3 PCCB_HUMAN
MAALLRAVAGRLSVIAPVAVRSIQCAQSTYNERIENKRTALLCGGQRIDAQKHKGTARIRLSDLLGKQVQVAVAGRHASEPKLPPELLLNKIAFMPPSQAMALGDKIASSIVAGTAGITPTLPWSQGLVDVQWENDFSK
QKICIMDQAITVYGAVYICGLNDSGAGRIQGVESLAGYADILFRNVATSGVLPQISILNGRCAGGAVSFALTDPTFMVKDTSYLFITGPDVVKSVTNEVDVQELGGAKTHTTMSGVARHAFENDVDALCNLRDPFN
YLPILSQDPAVPFRECCHDPSRDLVPELDTIVPLESTKAYNMVDIIRSVVDREFFELIMPNYAKNIIIVGFARMNGRTVQIVGNQPKVASGCLDINSSVKGARVFRFCDAFNPLITFDVDPGFLPGTAQYGGIIRHGAK
ILYAFARATVPKVTIVIRKAYGVAVVSSSKHLCGDNYNWPATAEIIVMGAKGAVEIIFKHENVEAAQAQYIEKFAFNFFPAVRGFDVDDIIQPSSTRARIICOLDVLASKKVQRPWRKHANIPL

MW:58178.750

Digest Matches (Score: 49.83)

Score = 49.830000, Rank = 7, Database = SwissProt, Accesskey = PCCB_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence
MSMS 91 844.610 1687.792 857819.000 2+ 249.304 4129 49 26 100 475 - 489 GHENVEAAQAEYIEK
MSMS 239 724.230 2171.113 1277891.000 3+ -201.397 7 18 33 000 144 - 165 IMDQAITVGAAPVILNDSGGAR 2: Oxidation (M)
MSMS 315 755.310 2264.047 6062823.000 3+ -58.324 15 36 400 446 - 466 HLCGDNTYAWPTAEIIVMGAK 18: Oxidation (M)
Acetyl-CoA carboxylase 1 OS=Homo sapiens GN=ACACA PE=1 SV=2 ACACA_HUMAN

NDEPSPLAQPLNELNQHRSRIIGSVSEDNSEDEISNLVKLDLLEEKRGSLSPASVSDTSLDGLISLQGLALHIRSSMSGLHLVKQGRDRKIDSQRDPTVASPAEFVTRFGGNVIERVKLIANNNGIAAVKCMRSIR
RNSYIEFNENRARIETVYVHTVEDLKANAYIKADHIVFVPGCPNNHYNANVELDIAIKTFIVQVAVAGRHASEPKLPPELLLNKIAFMPPSQAMALGDKIASSIVAGTAGITPTLPWSQGLVDVQWENDFSK
RLINVPOLEYKQYKAVYICGLNDSGAGRIQGVESLAGYADILFRNVATSGVLPQISILNGRCAGGAVSFALTDPTFMVKDTSYLFITGPDVVKSVTNEVDVQELGGAKTHTTMSGVARHAFENDVDALCNLRDPFN
YLPILSQDPAVPFRECCHDPSRDLVPELDTIVPLESTKAYNMVDIIRSVVDREFFELIMPNYAKNIIIVGFARMNGRTVQIVGNQPKVASGCLDINSSVKGARVFRFCDAFNPLITFDVDPGFLPGTAQYGGIIRHGAK
ILYAFARATVPKVTIVIRKAYGVAVVSSSKHLCGDNYNWPATAEIIVMGAKGAVEIIFKHENVEAAQAQYIEKFAFNFFPAVRGFDVDDIIQPSSTRARIICOLDVLASKKVQRPWRKHANIPL

MW:265384.850

Digest Matches (Score: 49.51)

Score = 49.510000, Rank = 8, Database = SwissProt, Accesskey = ACACA_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence
MSMS 449 946.880 2838.482 1202108.000 3+ 50.380 39 49 42 800 1123 - 1146 LILSETSIDVLNPFYHSNQVVR
MSMS 3891102.050 3303.672 231703.000 3+ 140.313 8 13 39 900 787 - 817 MVMTLTAVESGCIHYVKRPGAALDPGCVLAK 3: Oxidation (M) 12: Carbamidomethyl (C)
MSMS 3891102.050 3303.672 231703.000 3+ 140.313 8 13 39 900 787 - 817 MVMTLTAVESGCIHYVKRPGAALDPGCVLAK 1: Oxidation (M) 12: Carbamidomethyl (C)
60S ribosomal protein L31 OS=Homo sapiens GN=RPL31 PE=1 SV=1 RL1_HUMAN
MAPAKGGGEKKKGSAINVVTRYETITITISILIBGVCPKRAPALKEIKAFKMEGTPOVRITDRLNKAIVWAKGINRVPIRVLRSKRKNEDEDSFNKLYTLVTYVPTTFKNLQTVNVNEN

MW:14453.930

Digest Matches (Score: 44.70)

Score = 44.700000, Rank = 9, Database = SwissProt, Accesskey = RL31_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence
MSMS 341 823.110 1644.925 3113054.000 2+ 175.181 40 44 37 700 102 - 115 LYTLYTVYPTTTFK
60S ribosomal protein L18 OS=Homo sapiens GN=RPL18 PE=1 SV=2 RL18_HUMAN
NGVDIRHKKRVRKRPESDITLRLVLKFLRAARNSTFQVILKFLFMSKTRRPLSLSLNIRKMKLGRENKATAVVVGTTDDVRVQVPEPKVKVCLRVTSRARSRLIIRAQKILTFDQALDPSKGCQTVL
LSGRPKGRVYRHFKGAPDTPHSHTKPIVRSRGRKFERARGRASRGTKN

MW:21621.070

Digest Matches (Score: 41.75)

Score = 41.750000, Rank = 10, Database = SwissProt, Accesskey = RL18_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence
MSMS 186 673.170 1345.732 1678850.000 2+ -297.073 36 41 30 600 79 - 91 TAVVVGTTDDVR
Neurotrophin-4 OS=Homo sapiens GN=NTF4 PE=1 SV=1 NTF4_HUMAN
MLPFPSCSLPILLLPFLPVEISQDPPSTPLPTLAPEWDLISPRVILSRGAPGPLEFLLEAGAPRESAGAPANNRSRGVSETAPASRRGELDAVDSGWVTDRTTAVDLRGREVEVLGEVPAAGGSPLRQYTFPE
TRCDANAEAGGPGAGGCGRGVDRHNVSECKAQSYVRALTAQCGRGWRWIRIDTACVCTLLSRTGRA



[illegible]

Spectrum Analysis Report

Date: 10/11/2011 Time: 13:38

FileName: H:\Bruker-II F-disk\Stephie\081020\32Trypsin BE1 01 1560.d\32Trypsin BE1 01 1560.maf

DSNLSLEEL31SARQOPPT1TAPQAPAPAPATT7TGRAGGHPPEEL3LRSSKKRLEDETSCKTLL1DAYVWQYQKQGVALDGRVER1INSETMYL1KQVDEEAQAQKVFQKQVGLHAAQARQASGTPT7TPPKHP
DSRNFNFT7VTVTPADVPADSVOQRPSDADTKPRPALAAE11TCCPSAASATLQSKDQKTPGRPHRPAETSPMSALQGPPEELRAVAEGSTFPPEKPRPVOVKMASTSPSPAECHPCPAALQAEPTCCSQE
KLRPEPRRDGEQAEEASETOPLSPPPTAASKAPSSGSAQPPGHPGKQKPEPSRAKSRLPNMFKVL1PISAATKPPPT1ET7PPELTL1SPKGS1SEETHQKJKA1LSAQSAANVRKESLCPALLEVLTSSQESSE
SETDEDDDDYMDI

MW:246196.870

Digest Matches (Score: 32.25)

Score = 32.250000, Rank = 16, Database = SwissProt, Accesskey = CABIN_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt 2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 240 715.170 1429.717 3126677.000 2+ -268.887 34 32 33.100 1894 - 1906 QVDEEALEQAVK

[illegible]

MW:139900.720

Digest Matches (Score: 31.67)

Score = 31.670000. Rank = 17. Database = SwissProt. Accesskey = F193A HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.000000Da, ESI:11ypslin, Engine:Mascot V2.0.7
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 187 841.210 841.416 1259573.000 1+ -245.425 33 31 30.600 840 - 846 ESVVDHFR

[illegible]

MW:188952.580

Digest Matches (Score: 30.99)

Score = 30.990000. Rank = 18. Database = SwissProt. Accesskey = CE152 HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz:Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Search Parameters: MS1: 0.1-300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.000000Da, Enz: Trypsin, Engine: Mascot V2.7.0

MSMS 257 649.760 1947.083 11723537.000 3+ 93.718 35 30 33.800 1305 - 1322 TTQSALPLTSEMLIAVKK 12: Oxidation (M)

[illegible]

MW-93989.270

Digest Matches (Score: 28.90)

Score = 28.900000, Rank = 19, Database = SwissProt, Accesskey = A20A1_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz:Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt 2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 104 551.610 1102.502 4442087.000 2+ -262.577 30 28 26.700 785 - 793 LMNECDHLK

MSMS Logo 02 539.980 1617.85 1640253.000 3+ 45.670 11.13 40.500 478 - 491 QLEPTVQSLMKMSK
40S ribosomal protein S7 OS=Homo sapiens GN=RPS7 PE=1 SV=1 RST_HUMAN
 IYGGSRARVKNPEKXPKDPFSGISGLALHEMNSDLQAQLREINLTAAKRIIEVGGGGRKAIIFVPVVPQLKSPQIKQVRLVRELEKFSKSGHVHVAQRRILPKPTKRSRTNNKQKRPSRRTLAVHDAILEDLVFPSE
 IYGGSRARVKNPGSSRIKIVHLDAKQOONVEBKVEITGSGVYGVKKLAKGVNDVEFFPEPFLQ

MW:22113.260

Digest Matches (Score: 27.61)

Score = 27.610000, Rank = 20, Database = SwissProt, Accesskey = RS7_HUMAN

Score = 27.610000, Rank = 20, Database = SwissProt, Accesskey = RS7_HUMAN
Search Parameters: MS Tol :300.00 ppm MSMS Tol :1 100000Da Enz Trypsin Engine:Mascot Version:2.3.01.241 DB:SwissProt DB Version:SwissProt 2011_09 fasta

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz: Trypsin, Engine:Mascot V2.0.7
 Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Bt(min) Range Sequence

MSMS 498 356 560 1067 523 1839 121 000 3+ 133 728 12 8 44 900 161 - 169 AQQNNVFHK

Abbildung 8-8: Mascot-Report Kontroll-Eluat (Leervektor) 1.

Aufgeführt ist hier eine Liste experimenteller Daten der ersten zwanzig identifizierten Proteine der Probe.

Spectrum Analysis Report			
Date: 10/11/2011 Time: 13:48			
FileName: H:\Bruker-II_F-disk\Stephie\080527\Probe48_2h_BA3_01_924.d\Probe48_2h_BA3_01_924.mgf			
Sequence Name:	Parentmass:	0.000	Mass Error: -1.008
MH+ (mono): 1.008			
Sequence data:			
Intensity Coverage:	0.0 % (0 cnts)	Sequence Coverage MS:	0.0%
Sequence Coverage MS/MS:	0.0%	pl (isoelectric point):	0.0
Acquisition Parameter:			
Processing Parameter:			
Display Parameter:			
Parentmass:	0.000	Mass Error:	-1.008
MH+ (avg):	1.008	Tolerance (Da):	0.500
Above Threshold:	0	Assigned Peaks:	0
		MH+ (mono):	1.008
		Number of Peaks:	0
Matched Sequences:			
Unmatched			
Global peptide results			
Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1 TRYP_PIG			
FPTDDDDKIVGGVTCANSLPTQVSLNSGSHFCGSSLINSQVWVAARHCYSRIQVRLGEHNIDVLEGNQFINAAKIIITHPNFNGNTLNDIMLIKSSPATLNSRVATVSLPRSCAAAGTECLISGWNGTKSSGSS			
YPSLLQCLKAPVLSDDSSCKSSYPGQITGNMIVCGFLGGKDSQCGDSGGPVVCGNLQGGIVSWGYCAQKNKPGVYTKVNTVNMIIQQTIAAN			
MW:24393.810			
Digest Matches (Score: 172.72)			
Score = 172.716667, Rank = 1, Database = SwissProt, Accesskey = TRYP_PIG			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz. Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_57.12.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 289 1105.857 2211.104 136238.000 2+ -179.484 1631 131 36.531 58 - 77 LGEHNIDVLEGNQFINAAK			
MSMS 352 761.740 2283.180 139204.000 3+ 11.476 669 65 39.261 78 - 97 IITHPNFNGNTLNDIMLIK			
MSMS 331 767.050 2299.175 196069.000 3+ -17.505 190 57 38.282 78 - 97 IITHPNFNGNTLNDIMLIK 17: Oxidation (M)			
78 kDa glucose-regulated protein OS=Mus musculus GN=Hspa5 PE=1 SV=3 GRP78_MOUSE			
MHKFTVAAALLLLGAVRAEEDKKEVDVTVVLDLCTTSCVGVFKMORVEI IANDQCNRTFVVAFTPEERLIGDAAKWQLTSNPENTVDFAKRLIGRTWNDPVSQODIKFLPFKVVKKTKPYIQVDIGGGQT			
KTFAPAEISAVMLTKMKETAELGKVKVTHAVVTVPAVFNDARQATKDAQTAGLNVNRIINPTAAIAYGLDKREGKNIILVFDLGGGTFDVSLITDNGVFEVVAATNGDTHLGGEDFPDORVMEHFILYKKKTKG			
KDVFDKNRAVAKKREVEKAKALSSQHQARIEIESFFEGEDFSITLTKAFEEINMDLFRSTMKPVQKVLSDSLKKSIDIEIVLVGGSTPIKPIQLLVKEFFNGKEPSRGINPDEAVAYGAQVAGVLSGDDQDTGD			
LVLLDVCPFLTLGTETVGGVWTKLIPRNTVPTKKSQIFSTASDNQPTVTIKVYGEERPLTKDNLHLGTFDLTGIPAPRGVPQIVETTFEIDVNGILRVTAEDKGTGNKNKITITDQNRILTPEEIERMVNDKAEKFAEE			
DKKKKERIDTRNLESTAYSLKNQIGDKEKLGKLSSEDKETMEKAVEEKIEVLESHQDADIEDFKAKKKELEEIVQPIISKLYSGSGPPPTGEEDTSEKDEL			
MW:72377.460			
Digest Matches (Score: 118.15)			
Score = 118.150000, Rank = 2, Database = SwissProt, Accesskey = GRP78_MOUSE			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz. Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_57.12.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 329 830.378 1659.895 316569.000 2+ -88.159 16907 118 38.196 199 - 214 INEPTAAIAYGLDK			
MSMS 412 739.145 2215.233 57957.000 3+ 84.282 41 17 41.561 4 - 24 FTVVAAALLLLGAVRAEEDK			
ANIONIC TRYPSIN-1 OS=RATTUS NORVEGICUS GN=PRSS1 PE=1 SV=1			
MSALLLLALVGAAPFLEDDRIVGQYTCPEHSVPYQVSLNSGYHFCGSSLINDQWVVAARHCYSRIQVRLGEHNINVLGDEQFINAAKIIKHPNYSSTLNNIDIMLIKSSPVKLNARVAPVALPSACAPAGTQ			
CLTISGWNGLTSGVNNPDLQCVDAPVLSQADCEAATPGETTSSMTCVGLGGKDSQCGDSGGPVVCGNLQGGIVSWGYCALPDNPGVYTKVNTVNMIIQDTIAAN			
Digest Matches (Score: 113.12)			
Score = 113.120000, Rank = 3, Database = SwissProt, Accesskey = TRY1_RAT			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz. Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_57.12.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 289 1105.857 2211.104 136238.000 2+ -179.484 1158 113 36.531 73 - 92 LGEHNINVLGDEQFINAAK			
Uncharacterized protein C3orf19 homolog OS=Mus musculus PE=2 SV=1 CC019_MOUSE			
MDRKPKPLDVLTASSLVDLKAELFRQKEFQKELLDKSGVFGKPKTINRKRPSIWSKQNAVSTRAEKDAEQKLEEQKTLDKAREKLEEKAKLYEKMTKGDFLDEEVDWYLVDFTKRIIVKREMEVLGATRESQIEE			
ERDDDKVEFSDKDIPTFPDQFSEEWVDYDLSGRSRCKMNDLPSLLENDKLNQRLVPSPANETLLSEDMHRELGRQWEEERALKAPMGFIHYEDIRENARQLGVGFAPADRELNRKMKLTMLREQTT			
DQRITDENIKKEEAKMLAEALAKKQKMKKSEDCDEGREGADQVPEPDPVPPAPAPVANSKSEVYIIEQRDRTPKGVPIREWDRCKDFSPGWSKQSELRAERDEFPAPPSHYFVGQRKATPMSSQPGSR			
PGSAPDLGHSSGQSQSGSSHTSTPAESSQPAPVTFTQDLDDMISYYKQVT			
MW:53908.350			
Digest Matches (Score: 63.36)			
Score = 63.360000, Rank = 4, Database = SwissProt, Accesskey = CC019_MOUSE			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz. Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_57.12.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 132 575.356 1149.593 145795.000 2+ 96.736 43 63 31.174 123 - 132 KEMEVLGATR 3: Oxidation (M)			
NEUROFILAMENT MEDIUM POLYPEPTIDE OS=BOS TAURUS GN=NFMF PE=1 SV=3			
MSYTLDSLGNFSAVRYVETTRSSFSRIISGSPSGFRSGSRGSPVTSSSYKRSALAPRLTYSSAALLSSAESLDFQSSSLLDGGSGGGDYKLSRSNEKEIQGLNDRFAGYIEKVHYLEQQNKEIEAEIQAALRQ			
KQASHAQLDGDAYDQIRIELRATLEMVNHEKAQVQLDSHLEEDIRHLKRFEEEARLRDTEAARLALRKLDEESSLVKVELDKVKQSLQDEVAFRLSNHHEEVDALLAQIQASHITVERKDYLTIDISTALKEIRSQ			
LESSDQNMHQAEWFKCRYAKLTEAAEQNKRAISAKEEIAEYRRLQSKSIELESVGRGTESLERQLSDIEERHNDLSSYQDTIQOLENELRGTKWEMARHLREYQDLNINVKMALDIEIAAYRKLLEGEETRFST			
FAGSITGPLYTHRQPSIALSSIKQTKVEAPKLKVQHFKVVEEIIETTKVEDEKSEMEALTAITEELAVSVKEEVEKEEAEKEEKEEAEVEVAAKSPVKATAPELKEEKGKEEKEEKEEKEEKEEKEEKEEKEEKEEKEE			
GSGKSSSESEKSGEKEE			
PAPSVVEEVPKPAKAGAEKGEKVEEKEE			
KSGSGEKEGVVNLGSDVPGDEKKGDKSEKVVVTMKEVITSEGGDGTAKYITKSVTVTKRVEHEETFEELKLVSTKKEVVTSHAIKVEVTQSD			
Digest Matches (Score: 55.66)			
Score = 55.660000, Rank = 5, Database = SwissProt, Accesskey = NFM_BOVIN			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz. Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_57.12.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 229 499.316 499.287 313186.000 1+ 57.482 19 1 34.540 690 - 694 SPAPK			
MSMS 132 575.356 1149.527 145795.000 2+ 154.441 38 55 31.174 821 - 829 EEEQETKEK			
MSMS 397 780.064 1558.761 46241.000 2+ 230.510 10 8 40.939 22 - 36 SFSFSSGSPSSGFR			
HIRA-INTERACTING PROTEIN 3 OS=HOMO SAPIENS GN=HIRP3 PE=1 SV=3			
MAREKMQEFTSRFFRGRDPLSTLTHSVRRYLAHSGRSHLEPEEKQALKRLVEEELLMQVDEAASREDKDLTKKGRPRPTPCSDPERKFRFNSSESGSEASSPDYFGPAKNGVAAEVSPAKEENPRASKA			
VEESSDEERQDLPAQGEESSEEEKGYKTRKPKVVKQAPGKASVRKQAREESESEAEVPQRTAKVVEGNKGTSLKESEQSEEEILAQKKEQREEVEEKEEKEEKEEKEEKEEKEEKEEKEEKEEKEEKEEKEEKEE			
KQKQAKRLGLDSDSEEQKEAASGGDSDGRDREPPVQRKSEDRTLQKGGKRLSGSSEDEEDSGKEPTAKGSRMARLGTSGSESDLEREVSDESAGGGPQGERKNRSKRSKRGKTRSSSSSDSGSPKAGGGKA			
GSGRAREDDHAPVHRLKRIACGAHNNYKLLSGSCSHKRLSLRAELEALGKGTGSLGCRALKEQREAAEVASLDVANIISGSGRRPRRTANWPLGEAAPFGELYRRTLDSDEERPRAPFDWHRMGIISSD			
GESN			
Digest Matches (Score: 53.75)			
Score = 53.750000, Rank = 6, Database = SwissProt, Accesskey = HIRP3_HUMAN			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz. Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_57.12.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 132 575.356 1149.479 145795.000 2+ 195.914 53 53 31.174 240 - 248 EEEVEEEKEK			
MSMS 37 371.423 1482.667 6648.000 4+ 2.374 7 23 26.117 396 - 410 TRSSSSSSDGSPEAK			
60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Bos taurus GN=HSPD1 PE=1 SV=2 CH60_BOVIN			



Spectrum Analysis Report	
Date: 10/11/2011 Time: 13:49	
FileName: H:\Bruker-II_F-disk\Stephie\080527\Probe48_2h_BA3_01_924.d\Probe48_2h_BA3_01_924.mgf	
MLRLPAVLQRMPVSRALALHLTRAYAKDVKFGADARALMLQGVDLLADAVATMGPKGRTVIEIQSWGSPRVTKDGVTVAKSIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNNTNEAGDGTTTATVLARISIAKEGFEKISKGANPV EIRRGVHLAVDAVIELKQSKPVTTPPEEIAQVATISANGDKKEIGNISIDAMKVGKRGVITVKDGKTLNDELEIIEGMKFDGRIISPYFINTSKGQCEFPQDAYVLLSEKKISSVQSIVPALEIANAHKRPLVIAE VDVGEALSTLVNLRKLVGLQVAVKAPGFGDNRKMLKDMAITGGAVFGEGLMLNLEDDQPHDLGKVGVEIVTKDAMLLKGGKDRQAEIKRIQEIIBQLDITTSYEYKEKLERLAKLSDGVAVLKVGOTSDVEV NEKDRVYDALNATRAVEEIVLGGDCALLRLCIPALESTITPANEDQKTGIEIITKRLTIPAMTIAKNAGVEGSLIVERIMQSSSEVGDAMLGDFVNMVEKGIIDPTRKVVRTALLDAGVASLTLTAEVVVTPEKE EKDPGMGAMGGMGGMGGMF	
MW:61069.430 Digest Matches (Score: 52.78) Score = 52.780000, Rank = 7, Database = SwissProt, Accesskey = CH60_BOVIN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_57.12.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence MSMS 178 853.950 2560.249 40211.000 2+ -161.526 142 52 32 903 97 - 121 LVQDVANNNTNEEAGDGTTTATVLAR Tubulin alpha-1A chain OS=Cricetus tigris GN=TUBA1A PE=2 SV=1 TBA1A_CRIGR MRECIISIVHQGVQI GNACWELCYLEHGIQPDQMPSDKTIIGGDSDSFTTFSETGAGKHVPRAVFDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPPEQLITGKEDANNYARGHYTIKGEIIDLVLDRIRKLADQCTGLOGFLVF HSFGGOTSGSGTSLMLERLSVDYGGKSKLEFAIYPAPQVSTAVVEPYNSILTHTTLEHSDCAFVNDEAIYDICRRNLIDERPITYNLRLIGQIVSSITASLRFDGALNVDLTEFQTNLPVPYRIHFPLATYAPVI SAEKAYHQLSVAEITNACFEPANQVMKCDPRHGKYMACLLYRGVDVPKDVNAIAITIKTKRTIQFVDMCPTGFKGVINYPQPTVPPGGDLAKVQRAVCMLSNTTIAEAWARLDHKFDLMYAKRAFPVHWYVGEHGE EGEFSAEADMAALKEKYDEVGVDSVEGEAGEEY	
MW:50103.610 Digest Matches (Score: 51.93) Score = 51.930000, Rank = 8, Database = SwissProt, Accesskey = TBA1A_CRIGR Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_57.12.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence MSMS 182 508.241 1015.578 41541.000 2+ -101.807 578 51 33 006 327 - 336 DVNAIAITIK TYROSINE-PROTEIN KINASE TXK OS=HOMO SAPIENS GN=TXK PE=1 SV=3 MILSSSYNTIQSVQCCCCQVKQRMTQIISLTDEELPEKYTQRRRPNLSQLSNKKQSGNTGRVQPSKRPLPLPPSEVAEEKIQVKALYDFLPREPCNLALRRAEEYLILEKYNPHMKARDRLNGEGLIPSNVYT ENK1TNLIEIYWHYRNRITNQAEHLRLQESKEGAFIVRDSHLGDSITTSVPMGARRSTBAIKHYQIKNDSDGQNYVAERHAFQIPELIWHYQHNAAGLMTLRLYPVLGMGSLPATAGFSYKEWIDPSELAPIKE ISGSGQPVHLGEWRSKIVTAKHNSKEEDFIEAKHMKLSHSLVLGVGCTGRKPLIYVTTFHNGCLLAVLENKGLKRELLSVQCQDICEGMEYLERNGYIHRDLAARNCLVSSTCIKVISDFGMTRY VLDEYVSSFGAKFPIKWSGFVEFLVFNKYSKSDSVSPGLMKEVFTGKRFPEKSNLQVBAISEGRLYRPLALPMSIEYVMSCHWEKPERPTFELLKAVETIAETW	
Digest Matches (Score: 51.76) Score = 51.760000, Rank = 9, Database = SwissProt, Accesskey = TXK_HUMAN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_57.12.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence MSMS 132 575.356 1149.601 145795.000 2+ 89.881 72 51 31.174 170 - 179 EGAFIVRDSR THROMBOSPONDIN TYPE-1 DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 7A OS=HOMO SAPIENS GN=THSD7A PE=1 SV=3 NCLQARRNASGSRGAAGPRRVLQLLPLPLPLLLLLLLRPGAGRAAAGEAAPTILMKTGPMGRKMGDGCQGGIQTARAVWCARVEGWTTLTNCKQAERPNNQNCFKVCDMHKELYDNRLLGPNWRCOPVISK SLEKFLTEICGEGEIQVRIACIQKQKDIAPDITCEYFEFKLLSQACLIPQDQDQIVSEFSAMSSCSCTSGSLQKRRTRVAVAPPGQSGCPNLTEFQVQDSSCEAEELRSLVHGFPWSTCMFHSROVQRARR RGNKNEKDKRSKGVKDPARELLKXKNRNNRQNKQENKYWDIQGYQTRFVCMINKTKGAADLSFCQOEKLPMTFGSCVITGKECQVSEWSEWSPSKTCHDMVSPAGTRVTRTIRIQFPIGSEKCEPFEEKEPCLS QGDGVPCATYQWRMTTETECRVDPDLLSQQDKRRGNQTALCGGIIQTRREVYQANENLLSQLSTPMKNKASKPMDLKLCTGPIPMNTQLCHIPCCTCEVSPWSAWGPTCYENCNDQQGKGKFLKRRRITNEPTGG SGVTGNCPHLLAEICEEPACDYDKAVRLGDCEDPCEKQECQPTQVQEVVCIINSDEGEVDRLCRDAIFPIPVACDAPCPKDCVLSTWTSWSSCSHTCSGKTTEGQIARSLILAYAGEEGGIRCPNSAALQEVRSNC EHFCTVYHWQTPWQCCIDTIVSSSFTTTPNGEASCQVMQTRKICVRRVNVQGVGPKPCPSLRPETVRPCLLCKRDCIVTPYSQDWTSCPSSCEGSDSSIRKQSRHRVILQLPAMGDRCTDPLYEKACAEAPQ ACQSYRWHTKWRKQVIVRQVQDQSGAGQECGCPQASAITCRKQDQKQAGIEHQLGYAGFPVALQVQIPIQDQDQLPWSWSPSCNQCQCAVTRPRKTLVGKSKKEKCKNSHLVPLIETQYCPQDYNAQPI GNWSDILPEGKREVLVLMGVQDIEKQCGQYRYQAMACYDQNGRLVETSRCSNHCYIEEACIIPCPSDCKLSEWSNRSKSCGSGVKVRSKWLREKPYNGRGPCKPLDHNVAQGVVEVPHCSDCNQYLVMTFEW SICKVTFVNNRENCGEQVQTRKRCMQNTADGSEHVEDYLCDEPEMLGSRVCKLPCEPDCEISEWGPWTQCVLPCNQSSFRQRSADPIRQPADEGRSCPNAVEKEPCNLNKNCHYHVNVTWDSCTQLSEKAVCGN GIKTRMLDVCSDGSKVDLYCEALGLEKMQMNTSCMCEPVNCLSDWSWSECSQTCGLTKGMIIRRTVTQPPQDQGRPCPSLMDQSKPCPVKPCYRWQYQWNSPCQVQEAQCGEGTRNRNISCVVSGSDADFS RVVDEEFCADIELLIDGNKMNVLSESCBQPCGQCLYKDMSSWLSOLCTVNGEOLDGAGGIVQVRSRPVILQELNHLCPCEQMLETRISCTDQGCYETKWMASAWKGSRTVMQCRSDGIVNVTGGLVMSQPDADRSCN PCQSPHSYCSERTKTCHEEGTEYVSSNSLTQECTLIPVVLPETHEDKRDVKTSRAVHPTQSPSSNAPAGRGRTWFLQPFQDGLRKLFWYGVANGAFVLLIPIVSMITLACKKFKKQRRQNNRKLFLTLAYDGAD M	
Digest Matches (Score: 49.76) Score = 49.760000, Rank = 10, Database = SwissProt, Accesskey = THS7A_HUMAN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_57.12.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence MSMS 132 575.356 1149.495 145795.000 2+ 181.988 52 49 31.174 1116 - 1125 ENCGEGVQTR 3: Carbamidomethyl (C) Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1 HSP7C_HUMAN NSKGRVAVIDLQDTSYCVQVQSGRVEIANDGNRNTTSPYVAFDTOTERLIGDAKRVNMMNFTVFDARLIGRFPDADAVQSDMKHWPFPVNVNAGRPKVQVEYKGETSFPEEVSMSULTKMKELAEAYLQGT VTNAVVTVPYAFNDSQKATKQDQVQAGLMLVRIINSEPTAAAIAYGLQVGAERNVILFDLGGDFPEVKSATGDTLGGEDFDNRNMNHFAEFRRKKKDISENKRAVRRLRTACEARRTLSS STQASIEIDSLYEGIDFYSTIRARPEELNADLFRGTLDPVEKALRDALKDSQIHDVLVGGSTRIPIKILQLQDFPNGKELNKSINPDEAVYGAQAAILSGDKSENVQDLLLLDVTPLSLGIEITAGVMYTVLI KRNTTIPKTKQTFPTTYSQNDQGVLIQVEYGERAMTKDNNLGKFEITGPPAPRGVQPIEVTFDIDANGILNVSAVDKSTGKXKNIITINDKRLSKIEDIRMVQEAKEYKADEKQDKVSKNSLSYAFNMKAT VEDEKLQKINDEBQKIDLKNCNIEINWLDKXQTAKEEFEPHQKELEKVCNPIITKLQSGAGMGPMGPGFPGGGAFFPSGAGSSGPTIEVD	
MW:70854.220 Digest Matches (Score: 118.15) Score = 118.150000, Rank = 1, Database = SwissProt, Accesskey = HSP7C_HUMAN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence MSMS 329 830.380 1659.895 316569.000 2+ -85.868 16907 118 38 200 172 - 187 IINEPTAAAIAYGLDK HIRA-interacting protein 3 OS=Homo sapiens GN=HIRIP3 PE=1 SV=3 HIRP3_HUMAN MAREKMEQPTRSFRGRDPLSTLSTHSIVRRYLAHSGRSHLEPEEKQALKRLVEEELLKMQVDEAASREDKLDLTKKQGRPPTPCSDPERKRRFRFNSSESGSEASSPDYFGPPAKNVAAEVSPAENPRRASKA VEESDEERJDLPAQNGDESSEEEKGKTRKKFPVVKQAPGRASVBRQAKESESEAEPPORTAKKVEGNKGTASLKESEQSEEEILAQKKEQREVEEVEEKEEDEEKGDWPKPTRNSGNRRKSAREERSC FKQSKARLLGSDSEEEQEAASSGDDSGDRREPVRQKSEDTQLGKRLSGSSSEDEESGKEPTAKGSRMMARLGSQSESLLERFVDSIAAGQPGQERKMRSSKSSRWGRTSSSSSSSDSGPEAKGGA GSGRGEDEHFAVRLKRYIRACGAHRNKKLLGSCSHERKLSILRAELALGMKGTPTSLGKCALKEQREAEVASLDVANTIISGSGRPRRTAANPLGEAAPGELYRRTLSDSEERPPAPPDPWSHMRIISD GESN	
MW:61919.950 Digest Matches (Score: 53.75) Score = 53.750000, Rank = 2, Database = SwissProt, Accesskey = HIRP3_HUMAN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence MSMS 132 575.360 1149.479 145795.000 2+ 203.228 53 53 31 200 240 - 248 EEEVEEETK MSMS 37 371.420 1482.667 6648.000 4+ -5.725 7 23 28 100 396 - 410 THSSSSSDSGSPEAK 60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2 CH60_HUMAN MLRLPVTFRMQRVSRVLAHLTRAYAKDVKFGADARALMLQGVDLLADAVATMGPKGRTVIEIQSWGSPKVTKDGVTVAKSIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNNTNEAGDGTTTATVLARISIAKEGFEKISKGANPV EIRRGVHLAVDAVIELKQSKPVTTPPEEIAQVATISANGDKKEIGNISIDAMKVGKRGVITVKDGKTLNDELEIIEGMKFDGRIISPYFINTSKGQCEFPQDAYVLLSEKKISSIQSIVPALEIANAHKRPLVIAE VDVGEALSTLVNLRKLVGLQVAVKAPGFGDNRKMLKDMAITGGAVFGEGLMLNLEDDQPHDLGKVGVEIVTKDAMLLKGGKDRQAEIKRIQEIIBQLDVTTSYEYKEKLERLAKLSDGVAVLKVGOTSDVEV NEKDRVYDALNATRAVEEIVLGGDCALLRLCIPALDSLTIPANEDQKTGIEIITKRLTIPAMTIAKNAGVEGSLIVERIMQSSSEVGDAMAGDFVNMVEKGIIDPTRKVVRTALLDAGVASLTLTAEVVVTPEKE EKDPGMGAMGGMGGMGGMF	
MW:61016.380 Digest Matches (Score: 52.78) Score = 52.780000, Rank = 3, Database = SwissProt, Accesskey = CH60_HUMAN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence MSMS 178 853.950 2560.249 40211.000 3+ -161.409 142 52 32 900 97 - 121 LVQDVANNNTNEEAGDGTTTATVLAR Tubulin alpha-3C/D chain OS=Homo sapiens GN=TUBA3C PE=1 SV=3 TBA3C_HUMAN MRECIISIVHQGVQI GNACWELCYLEHGIQPDQMPSDKTIIGGDSDSFTTFSETGAGKHVPRAVFDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPPEQLITGKEDANNYARGHYTIKGEIIDLVLDRIRKLADLCTGLOGFLVF HSFGGOTSGSGTSLMLERLSVDYGGKSKLEFAIYPAPQVSTAVVEPYNSILTHTTLEHSDCAFVNDEAIYDICRRNLIDERPITYNLRLIGQIVSSITASLRFDGALNVDLTEFQTNLPVPYRIHFPLATYAPVI SAEKAYHQLSVAEITNACFEPANQVMKCDPRHGKYMACMLYRGVDVPKDVNAIAITIKTKRTIQFVDMCPTGFKGVINYPQPTVPPGGDLAKVQRAVCMLSNTTIAEAWARLDHKFDLMYAKRAFPVHWYVGEHGE EGEFSAEADMAALKEKYDEVGVDSVEAEAGEEY	



Spectrum Analysis Report	
Date: 10/11/2011 Time: 13:49	
FileName: H:\Bruker-II_F-disk\Stephie\080527\Probe48_2h_BA3_01_924.d\Probe48_2h_BA3_01_924.mgf	
MW:49927.600 Digest Matches (Score: 51.93) Score = 51.930000, Rank = 4, Database = SwissProt, Accesskey = TBA3C_HUMAN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence MSMS 182 508.240 1015.578 41541.000 2+ -103.975 578 51 33.000 327 - 336 DVNAAIAITK MSMS 385 729.300 1457.869 41147.000 2+ -189.356 6 - 40.400 230 - 243 LIGQIVSSITASLR TYROSINE-PROTEIN KINASE TXK OS=HOMO SAPIENS GN=TXK PE=1 SV=3 TXK_HUMAN MILSSSYNTIQSVFCCOCCSVQKRWMTQIGLSBTDDELPKRYTQRRRPWLSQLSMKKQSTGRVQPSKRRPLPLPPSEVAEEKIQVKALYDPLPREPCNLALRRABEYLILERYNPHWPKARDRLNGEGLIPSNVT ENK1TNLEIYEWHRN1TRWQAEILLRQESKEGAPTVRDSRHLGSYIVSVPRARSRBAAKHYQIKRNDQGWVVAERHAFOSIPELIYWHQNAAGLWMLRLRYVGLMGSCLPATAQGSYEEKWIDPSELAFIKE IQSGQPGVHLGDNWSHIIQVAIKAINEGMSSEDFIEAKYWMKLSHSKLVQLYGVCIQRKPLVIVTEPMENGCLLNLYRENKGLKRKMLLSVCQDICEGMEYLERNGYIHRDLAARNCLVSSSTCIWKISDFQWTRY VLDDDEVVSFSGAKFPFIKMSPEVEFLFNKYSKSDVWSFGVLMEVEFTGKMPFNKSNLQVVEASEGFRILYRPLHALPMSIYEVMSYSHWHEKPEGRPTFAELLRAVTEIAETW Digest Matches (Score: 51.76) Score = 51.760000, Rank = 5, Database = SwissProt, Accesskey = TXK_HUMAN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence MSMS 132 575.360 1149.601 145795.000 2+ 97.194 72 51 31.200 170 - 179 EGAFIVRDSR THROMBOSPONDIN TYPE-1 DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 7A OS=HOMO SAPIENS GN=THSD7A PE=1 SV=4 THSD7A_HUMAN MGLQARRWASCSNLAGPFRVLIQLPLPLPLPLILLILLIPAGAGRAAQAQGEAAEPTLIWITCTPWGRCHWDGCGGIGITRAVWCARHVEGWTTLHTWCQAEKPNMQNCFKVDHKKELYDWRLGPNNQCGVPVISK SLEKPLECTICEGEGIVREIACIQDKDIPAEIDIICEYFEPKPLLEQAQLIPCQDQCIVSEFSAWSECSKTCGSGLQHRTRHVVAUPQFGGSGCNPLTEFQVCGSSPCEAEELRYLSLHVGPWSTCSMPHSQVROARR RGKNKEREKRSKGVDPPEARELIKKRNRRNRQNRQENYWDIQIGVQITREVCMINKTKGAADLSEFCQKLPMTFQSCVITKECQVSEWSEWSPCSEKTDHVMSPAGTRVTRTTRIROPFIGSEKCEPHEEKEPCL QDQGVVPCATYGNRTTEWTECRVDPLLSQDQKRRNQATALCGGGIQTREYVCYQANENLLSGLSTHNKEASKPMDLKLCTGPIINTTOLCHICPCTECEVSPWAGWPCTEYENCDQOQKGFKLKRRIINTEPTGG SGVTGNCNHLLEAIPCPEEACDYNKAVRLGNCEPONGRECGPOTQVQVEVVCINSDSGEVDRGLCRDAIFP IPVACDAPCDKCVLSTWSSCSHTCSGKTETGQIRARSILAYAGEEGICPCNSSALQAEVRSCH EHPCTVYHQVGPWQOQIEDTSUSFNTTTTNGWASCSYVGMQTRVIVCVRWVQQVQPKKCPSELRETPVRCLLPCKDKDIVPTYSOWTSCPSCKSGDGSIRKGSRRHVIQLPANQGDCTDPLVEEKEACEAP ACQSYKWKTHKWRRCQLVPVMSVQDQSPGAECCGQGRQARAITCKRQDGGQAQIEHCQLYAGVPALTAQACIQPCQDDCOLTSWKSFPSSCNGDCGAVTRKRTLVGKSKKKECKNSHLXPLIETQYCPCKYNAQPV GNNSDCILPEGRKVEYVLGMKRVQDIEKCGQGRYQAMACYDQNGRLVETSRCSNHSYIEAACIIPCPSDCKLSEWNSRCSKSGSGVKVRSKWLREKPYNGRRPCPLDHVNAQVYEVVPCSDHSCDMLWTEPV SICKVTFVNMKRCNGEQVQTRKVRCKMNTADGPHSEHVEDYLCDPEEMPLGSRVCKLPCPEDCVI SEWGPTWQCVLPNCQSSFRORSADPIRQPADEGRSCPNVAKEEPCNLNKNCHYDVNVDTWSTCOLSEKAVCGN GIRTRMLDCVRSQDLYKYCEALGELKNQMNTSCMVECPVMOGLSDSPWSECSQTCGLTKMIRRTVTQTPFQDQGRPCPSLMDQSKPCVPKPCYRWGYQVSPQVQBAQCGEGTRFNIRISCVVSDGSDADFS KYVDBFCADILIIDKNQGLKESCGSOPCDKQKLLSEKQGLQCLTGVNGLVDYADIRMAQIQVHSPVITIQELNQHCLPQOMLETKSCYDQCYEYKWMASAWKSSRTVWCQSDGIVNTPQGLVMSQPDADRSCH PPCSOPHSYCSSETKTCHEGVEYVMSNSNSTLEQCTLIPVVVLTMEDKRRQVKTSRAPVTPQSSNPAGRGRTWFLQFPQDGRKLTWVGVGAAGAFVLLIFIVSMIYLACKKPKPKQRQNNRLKPLTLAYDGDAD M Digest Matches (Score: 49.76) Score = 49.760000, Rank = 6, Database = SwissProt, Accesskey = THSD7A_HUMAN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence MSMS 132 575.360 1149.495 145795.000 2+ 189.302 52 49 31.200 1116 - 1125 ENCGEGVQTR 3: Carbamidomethyl (C) Tumor protein D54 OS=Homo sapiens GN=TPD52L2 PE=1 SV=2 TPD54_HUMAN MDSAGQDNLNSWNSGLSDSMTDVPDTCVAARTPAVBELEAEELRAELTYVEERIVTLQVLAAKERHCGELKRRLLGLSTLGEKQLNLSRSWHDVQVSSAYVKTSEKLGWNEKVTQSDLYKKTQETLSQAGQ KTSAAALSTVGSATSKRLGDNRNSATPKSFEDRVGTIKSKVVGDRENGSDNLPSSAGSGDKPLSDPAFF MW:22224.270 Digest Matches (Score: 43.91) Score = 43.910000, Rank = 7, Database = SwissProt, Accesskey = TPD54_HUMAN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence MSMS 157 515.870 1030.614 642218.000 2+ 115.047 521 43 32.200 81 - 90 LGLSTLGELEK Sterile alpha motif domain-containing protein 9-like OS=Homo sapiens GN=SAIMD9L PE=1 SV=2 SAM9L_HUMAN MSKQVSLPENIKDWTKEHVKXWNEDLKINEQVGLLSEEVTLVLQELTERKDLVEMGLPWGPALLIKRSYNKLNSKSPESDNHDPQGLDQNSPKSKEHQKNPKHTKKEENSMSSNIIYDPRERIDIKQESISLMK ENVLDVANAKHKKKGLKPEQLTCMPYFPDQDHSRHYIEHTYQLPQETGALNLDIPHEFKALTNTETATEVDIKMKFSNEVFRFASACMNSNTNGTIFPGVDKDPHGEIVGVKTIKSAAPIDHFNWIKKYFESE INEAKKCIIEPRFVEVLQNTTPSDRFEIVEDTIPKHSICNDKYFFYIQMOICKDKIQKQNLNLSLFGVREGASSRDILANSQRQDVDFKAFIQLNLSLVASRKEAEYEGMKAMKKESEGLKVLKLLIGNRDLSNYSY DWYILVTNCKHPQIKKHLDFLKEIKWFAVLEFPDPSHNGVVAAYKESRVANLHFPNQIEDKTTNNWKKIISTNLNYQQPSWIFCNGRSDLSKPTVKPLFELHWQREARASEVRKLLIFLTDENINTRGKFLVFWLLSS GVSWDNVFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVNFFSESSDFVKRDSYEKLDLHICNAESPCKPIFAKINILYHPHCGCGTTLAHMHVLDLKKNFRCAVLNKKTTDFAEIAEQVINLVTRYAKSHQDYIPLVLLVDQPEEQHENVLQNAIHSVLAEDKLR YEKTVIILNLCMRSNPNDESAKADSLALNYQLSSKEQRAFKAELKEIQHKNCENFYSPHIMKSNFDETYIENVVRNLIKQGVQDSKEAQLISFLALLSSVYDTSITVSQCEILFGLIYTSFWPEPSELEDMKOT YSTLLIKTEVAEGRYTGVRIIHPILIALYCLKELERSYHLDKQCIJALNILEENLFLYDSGIGRDKFQHDQVQTLTLTRQRKYVGDEDTLFSPLMEALQNKDIEKVLASGSRFPQNAFICQALARHFYIEKEDFNALD WARQAKMAPKNSYISDITLQVYKSEIKWLDGNKNCRSITVNDLTHLEAAKASRAFKEQRQSDRTSEYTEMWSPQKSRQRYDMYNTACPLGEIEVGLYTIQILQTLTPFFHKENELSKKRWQVLSGKWITIPDP VETSDPLLETFRNAPYQALKNEMWMLCISVNSHIVQBNKLLQTNKMEDELWNISITNLINLWSTILKLSVTRSSRRPLPARQSSSVILEKKEDVLTALEILCENECETDIEBKSKFELVQKESKEEHPYRG KYSWNVN	

Spectrum Analysis Report			
Date: 10/11/2011 Time: 13:49			
File Name: H:\Bruker-II\F-disk\Stephie\080527\Probe48_2h_BA3_01_924.d\Probe48_2h_BA3_01_924.mgf			
VSQILRLQOCTKACELFLNRNAAVHTAIQRLREGATLLYIHKLVHFFTSLLETAREFIDFAGTDSGCYSAFVVWARSAMGMVFADPSKVDFSDKESLSTAECVKVAKHECQQLGDIGLDLTFIHALLVKDIO GALHSYKEIIIEATHRHNSEHWRRMNLMTPEALGKIKKEEMKSCGVSNFEQYTGDDCWNLSTYVPAFTKQTMGFLAEALKYFPELHMVLLSELVEIILVAVQHVDSLRCQDPEKKAFIRQNASFLYETVLPVVE KRFEEGVGKPAKQLQDRNASHLRVNPSTTSV			
Digest Matches (Score: 41.72)			
Score = 41.720000, Rank = 11, Database = SwissProt, Accesskey = EXOC8_HUMAN			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.00000Da, Enz. Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 89 581.410 1161.663 214819.000 2+ 129.348 34 41 29.400 261 - 270 IFOAENAKIK			
Leucine-rich repeat-containing protein 36 OS=Homo sapiens GN=LRC36 PE=2 SV=2 LRC36_HUMAN			
MAEQWLEDEEIGIRRGALTEQPELVESLSQGSYAGKIHISIGDAFRNFKNLRSGLDSRLNLTSLGKIQVLCSDLQDLNLYNNIPSLVEVSRLQPLFLKELDLRLNPPVRKDTDYRLFVAYTTLQTEKLLDDRTVREG ERKAALHFGSQLGENSEFNILLEVEKSSREKTHKNCYVTEGSSASKYSANVSRIRIEMDSNKGILPFPFNRRIKIDSLSTASQNGTQRDQKLDITPFLGTQTOQVAREMPSDNNHQDEDFRHYSPQGTVRSPEKMTREGYQV SFLQWKSQGSPEKELIPKPPDPTLHDSASLKLQWGDSSQIHPQQLPDUVELVEDSCQSQTLELHSGLSKRRQSRNVEQISLTKPSNDIKTASHSCGDLCELSPDSSTGRLLKLSGLYATPHNSDPVIL NVEQQLSTSLDDLTAMHSGVFNNAVGNRTPTLRLTLTLSPQTEHRKIFPKRSLSPSKRGFKWKNILANLNKLHGFQDQATSEPLSSDLQSLHGLAGNHSPPISARTPHVATVLRQQLLELVDKHNWSSGSLLNKKPF LGPARDLLSLVVPAPSQPRCSHPFDTKMAFCRRELEKEAAQLVPMNMESLKQKLVRLVEENLLSEKIQQLEEGAASIVSGQSTHYTDLLHKNQQLTMQVACLNQELAQLKLEKTVAILHESQSLVVTNEY LQQLKNKPKYSGKALLPPEKGHHGLGSSPPFGKSTLSSSSPAVHETQVLLIQSVLDAAPPEGL			
MW:83771.000			
Digest Matches (Score: 41.54)			
Score = 41.540000, Rank = 12, Database = SwissProt, Accesskey = LRC36_HUMAN			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.00000Da, Enz. Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 295 772.880 1544.762 289532.000 2+ -6.300 83 41 36.700 593 - 606 EAAQLVPNDMESLK			
CHOLINE-PHOSPHATE CYTIDYLTRANSFERASE B OS=HOMO SAPIENS GN=PCYT1B PE=1 SV=1 PCY1B_HUMAN			
MPVVTDDAESETGIPKLSLNEPPESTMEIEHTCQPRLTLTAPAPFADETNCQQAPEKLTIAQARGLTPADRPVRVYADGIFDLFSGHAGALMQAKTLFPNSYLLVGVCSDDLTHKFKGTPVNEAEYEAELRH RCYVDEVIRDAPPTLTPFELEKHKIDFVAHDDIPIYSSAGSDVYKIHKEAGMFPVTPQRTGISTSDIITRIVRDVYARNRLOGRYTAKELNVSFINEKRYRFQNVQDKMEKVKMVEERSKEFPVNRVEEKSHDIOJ KWEKSRFIGNLFLPGDGAWKQMFQSSRMLQALSPKQSPVSSPTRSRSPSRSPSTFWPLKLTSPSPSKAASASISSMSEGEDEK			
Digest Matches (Score: 41.50)			
Score = 41.500000, Rank = 13, Database = SwissProt, Accesskey = PCY1B_HUMAN			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.00000Da, Enz. Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 132 575.360 1149.590 145795.000 2+ 106.987 46 41 31.200 262 - 270 EFNVRVEEK			
TBC1 DOMAIN FAMILY MEMBER 14 OS=HOMO SAPIENS GN=TBC1D14 PE=1 SV=3 TBC14_HUMAN			
MTDGKLSSTNGVAFMGIIDGRPGNPLQNLQHVNLKAPRLLSAPEYGPKLKLRALEDHRHLSQVSDSGLPTLEIGNPEPVPSCAVHVRKQSDSDLIPERAPQACALPSCAPPAPPSSTEREQSVKSSSTFPRTGYDSV KLYSPSTKALTRSDSDVSCVSSIGTELSTLTLSVNSDILDLIVTSSSSAIVTLENDDDPQFTNVTLSIKETRGHQAQDCVHEAEESGKLKILGPPSNFFARNILLARKQSARLDKINDIGLQKLPKAKLRENAQKDS RCYVDEVIRDAPPTLTPFELEKHKIDFVAHDDIPIYSSAGSDVYKIHKEAGMFPVTPQRTGISTSDIITRIVRDVYARNRLOGRYTAKELNVSFINEKRYRFQNVQDKMEKVKMVEERSKEFPVNRVEEKSHDIOJ KWEKSRFIGNLFLPGDGAWKQMFQSSRMLQALSPKQSPVSSPTRSRSPSRSPSTFWPLKLTSPSPSKAASASISSMSEGEDEK			
Digest Matches (Score: 41.02)			
Score = 41.020000, Rank = 14, Database = SwissProt, Accesskey = TBC14_HUMAN			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.00000Da, Enz. Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 160 409.280 1225.630 37947.000 3+ 157.852 36 10 32.200 252 - 261 LDKHNDLGWK			
Obscurin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=OBSL1 PE=1 SV=4 OBSL1_HUMAN			
MKASSGDGSGPFCFLRPPFPVVRVVSAGAEALKCVVLGEPFPVVVNEKGGQQLAASERLSFPADGAHEGLLTLAALPTDAGVYVCARNAAAGEAYAAAAVTVLEPPASDPQLQPAERLPLSPSGEGEAPVFLTGPRSQW VLRADEVVLTCRAGGLPEPTLYNEKGDMALDEVNDSSHFAIPQGRAEDGFGASLALRILAARLPDGSGVYVCARNAHGAQAGALLQVHPQPPSPADPDEAPAPVVEPLKCAPKTFVWNEKGKHAFCYVMKGPEPE IEWHGEKRLPLDPRRMLMYDRDGGVFLKVLVQAKDRGLVLCVCAARNSAGQTLASAVQLKVEPEKRLRTPRQLQDVEGREGIATVLECKVPNSRIPPTAFWFDQRLLDCKRYEQIEEGTVRLRIIHRKADDDGTLICEM RCYVDEVIRDAPPTLTPFELEKHKIDFVAHDDIPIYSSAGSDVYKIHKEAGMFPVTPQRTGISTSDIITRIVRDVYARNRLOGRYTAKELNVSFINEKRYRFQNVQDKMEKVKMVEERSKEFPVNRVEEKSHDIOJ KWEKSRFIGNLFLPGDGAWKQMFQSSRMLQALSPKQSPVSSPTRSRSPSRSPSTFWPLKLTSPSPSKAASASISSMSEGEDEK			
Digest Matches (Score: 40.05)			
Score = 40.020000, Rank = 14, Database = SwissProt, Accesskey = TBC14_HUMAN			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.00000Da, Enz. Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 160 409.280 1225.630 37947.000 3+ 157.852 36 10 32.200 252 - 261 LDKHNDLGWK			
Obscurin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=OBSL1 PE=1 SV=4 OBSL1_HUMAN			
MKASSGDGSGPFCFLRPPFPVVRVVSAGAEALKCVVLGEPFPVVVNEKGGQQLAASERLSFPADGAHEGLLTLAALPTDAGVYVCARNAAAGEAYAAAAVTVLEPPASDPQLQPAERLPLSPSGEGEAPVFLTGPRSQW VLRADEVVLTCRAGGLPEPTLYNEKGDMALDEVNDSSHFAIPQGRAEDGFGASLALRILAARLPDGSGVYVCARNAHGAQAGALLQVHPQPPSPADPDEAPAPVVEPLKCAPKTFVWNEKGKHAFCYVMKGPEPE IEWHGEKRLPLDPRRMLMYDRDGGVFLKVLVQAKDRGLVLCVCAARNSAGQTLASAVQLKVEPEKRLRTPRQLQDVEGREGIATVLECKVPNSRIPPTAFWFDQRLLDCKRYEQIEEGTVRLRIIHRKADDDGTLICEM RCYVDEVIRDAPPTLTPFELEKHKIDFVAHDDIPIYSSAGSDVYKIHKEAGMFPVTPQRTGISTSDIITRIVRDVYARNRLOGRYTAKELNVSFINEKRYRFQNVQDKMEKVKMVEERSKEFPVNRVEEKSHDIOJ KWEKSRFIGNLFLPGDGAWKQMFQSSRMLQALSPKQSPVSSPTRSRSPSRSPSTFWPLKLTSPSPSKAASASISSMSEGEDEK			
Digest Matches (Score: 40.05)			
Score = 40.020000, Rank = 14, Database = SwissProt, Accesskey = TBC14_HUMAN			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.00000Da, Enz. Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 160 409.280 1225.630 37947.000 3+ 157.852 36 10 32.200 252 - 261 LDKHNDLGWK			
Obscurin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=OBSL1 PE=1 SV=4 OBSL1_HUMAN			
MKASSGDGSGPFCFLRPPFPVVRVVSAGAEALKCVVLGEPFPVVVNEKGGQQLAASERLSFPADGAHEGLLTLAALPTDAGVYVCARNAAAGEAYAAAAVTVLEPPASDPQLQPAERLPLSPSGEGEAPVFLTGPRSQW VLRADEVVLTCRAGGLPEPTLYNEKGDMALDEVNDSSHFAIPQGRAEDGFGASLALRILAARLPDGSGVYVCARNAHGAQAGALLQVHPQPPSPADPDEAPAPVVEPLKCAPKTFVWNEKGKHAFCYVMKGPEPE IEWHGEKRLPLDPRRMLMYDRDGGVFLKVLVQAKDRGLVLCVCAARNSAGQTLASAVQLKVEPEKRLRTPRQLQDVEGREGIATVLECKVPNSRIPPTAFWFDQRLLDCKRYEQIEEGTVRLRIIHRKADDDGTLICEM RCYVDEVIRDAPPTLTPFELEKHKIDFVAHDDIPIYSSAGSDVYKIHKEAGMFPVTPQRTGISTSDIITRIVRDVYARNRLOGRYTAKELNVSFINEKRYRFQNVQDKMEKVKMVEERSKEFPVNRVEEKSHDIOJ KWEKSRFIGNLFLPGDGAWKQMFQSSRMLQALSPKQSPVSSPTRSRSPSRSPSTFWPLKLTSPSPSKAASASISSMSEGEDEK			
Digest Matches (Score: 40.05)			
Score = 40.020000, Rank = 14, Database = SwissProt, Accesskey = TBC14_HUMAN			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.00000Da, Enz. Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 160 409.280 1225.630 37947.000 3+ 157.852 36 10 32.200 252 - 261 LDKHNDLGWK			
Obscurin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=OBSL1 PE=1 SV=4 OBSL1_HUMAN			
MKASSGDGSGPFCFLRPPFPVVRVVSAGAEALKCVVLGEPFPVVVNEKGGQQLAASERLSFPADGAHEGLLTLAALPTDAGVYVCARNAAAGEAYAAAAVTVLEPPASDPQLQPAERLPLSPSGEGEAPVFLTGPRSQW VLRADEVVLTCRAGGLPEPTLYNEKGDMALDEVNDSSHFAIPQGRAEDGFGASLALRILAARLPDGSGVYVCARNAHGAQAGALLQVHPQPPSPADPDEAPAPVVEPLKCAPKTFVWNEKGKHAFCYVMKGPEPE IEWHGEKRLPLDPRRMLMYDRDGGVFLKVLVQAKDRGLVLCVCAARNSAGQTLASAVQLKVEPEKRLRTPRQLQDVEGREGIATVLECKVPNSRIPPTAFWFDQRLLDCKRYEQIEEGTVRLRIIHRKADDDGTLICEM RCYVDEVIRDAPPTLTPFELEKHKIDFVAHDDIPIYSSAGSDVYKIHKEAGMFPVTPQRTGISTSDIITRIVRDVYARNRLOGRYTAKELNVSFINEKRYRFQNVQDKMEKVKMVEERSKEFPVNRVEEKSHDIOJ KWEKSRFIGNLFLPGDGAWKQMFQSSRMLQALSPKQSPVSSPTRSRSPSRSPSTFWPLKLTSPSPSKAASASISSMSEGEDEK			
Digest Matches (Score: 40.05)			
Score = 40.020000, Rank = 14, Database = SwissProt, Accesskey = TBC14_HUMAN			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.00000Da, Enz. Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 160 409.280 1225.630 37947.000 3+ 157.852 36 10 32.200 252 - 261 LDKHNDLGWK			
Obscurin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=OBSL1 PE=1 SV=4 OBSL1_HUMAN			
MKASSGDGSGPFCFLRPPFPVVRVVSAGAEALKCVVLGEPFPVVVNEKGGQQLAASERLSFPADGAHEGLLTLAALPTDAGVYVCARNAAAGEAYAAAAVTVLEPPASDPQLQPAERLPLSPSGEGEAPVFLTGPRSQW VLRADEVVLTCRAGGLPEPTLYNEKGDMALDEVNDSSHFAIPQGRAEDGFGASLALRILAARLPDGSGVYVCARNAHGAQAGALLQVHPQPPSPADPDEAPAPVVEPLKCAPKTFVWNEKGKHAFCYVMKGPEPE IEWHGEKRLPLDPRRMLMYDRDGGVFLKVLVQAKDRGLVLCVCAARNSAGQTLASAVQLKVEPEKRLRTPRQLQDVEGREGIATVLECKVPNSRIPPTAFWFDQRLLDCKRYEQIEEGTVRLRIIHRKADDDGTLICEM RCYVDEVIRDAPPTLTPFELEKHKIDFVAHDDIPIYSSAGSDVYKIHKEAGMFPVTPQRTGISTSDIITRIVRDVYARNRLOGRYTAKELNVSFINEKRYRFQNVQDKMEKVKMVEERSKEFPVNRVEEKSHDIOJ KWEKSRFIGNLFLPGDGAWKQMFQSSRMLQALSPKQSPVSSPTRSRSPSRSPSTFWPLKLTSPSPSKAASASISSMSEGEDEK			
Digest Matches (Score: 40.05)			
Score = 40.020000, Rank = 14, Database = SwissProt, Accesskey = TBC14_HUMAN			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.00000Da, Enz. Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 160 409.280 1225.630 37947.000 3+ 157.852 36 10 32.200 252 - 261 LDKHNDLGWK			
Obscurin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=OBSL1 PE=1 SV=4 OBSL1_HUMAN			
MKASSGDGSGPFCFLRPPFPVVRVVSAGAEALKCVVLGEPFPVVVNEKGGQQLAASERLSFPADGAHEGLLTLAALPTDAGVYVCARNAAAGEAYAAAAVTVLEPPASDPQLQPAERLPLSPSGEGEAPVFLTGPRSQW VLRADEVVLTCRAGGLPEPTLYNEKGDMALDEVNDSSHFAIPQGRAEDGFGASLALRILAARLPDGSGVYVCARNAHGAQAGALLQVHPQPPSPADPDEAPAPVVEPLKCAPKTFVWNEKGKHAFCYVMKGPEPE IEWHGEKRLPLDPRRMLMYDRDGGVFLKVLVQAKDRGLVLCVCAARNSAGQTLASAVQLKVEPEKRLRTPRQLQDVEGREGIATVLECKVPNSRIPPTAFWFDQRLLDCKRYEQIEEGTVRLRIIHRKADDDGTLICEM RCYVDEVIRDAPPTLTPFELEKHKIDFVAHDDIPIYSSAGSDVYKIHKEAGMFPVTPQRTGISTSDIITRIVRDVYARNRLOGRYTAKELNVSFINEKRYRFQNVQDKMEKVKMVEERSKEFPVNRVEEKSHDIOJ KWEKSRFIGNLFLPGDGAWKQMFQSSRMLQALSPKQSPVSSPTRSRSPSRSPSTFWPLKLTSPSPSKAASASISSMSEGEDEK			
Digest Matches (Score: 40.05)			
Score = 40.020000, Rank = 14, Database = SwissProt, Accesskey = TBC14_HUMAN			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.00000Da, Enz. Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 160 409.280 1225.630 37947.000 3+ 157.852 36 10 32.200 252 - 261 LDKHNDLGWK			
Obscurin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=OBSL1 PE=1 SV=4 OBSL1_HUMAN			
MKASSGDGSGPFCFLRPPFPVVRVVSAGAEALKCVVLGEPFPVVVNEKGGQQLAASERLSFPADGAHEGLLTLAALPTDAGVYVCARNAAAGEAYAAAAVTVLEPPASDPQLQPAERLPLSPSGEGEAPVFLTGPRSQW VLRADEVVLTCRAGGLPEPTLYNEKGDMALDEVNDSSHFAIPQGRAEDGFGASLALRILAARLPDGSGVYVCARNAHGAQAGALLQVHPQPPSPADPDEAPAPVVEPLKCAPKTFVWNEKGKHAFCYVMKGPEPE IEWHGEKRLPLDPRRMLMYDRDGGVFLKVLVQAKDRGLVLCVCAARNSAGQTLASAVQLKVEPEKRLRTPRQLQDVEGREGIATVLECKVPNSRIPPTAFWFDQRLLDCKRYEQIEEGTVRLRIIHRKADDDGTLICEM RCYVDEVIRDAPPTLTPFELEKHKIDFVAHDDIPIYSSAGSDVYKIHKEAGMFPVTPQRTGISTSDIITRIVRDVYARNRLOGRYTAKELNVSFINEKRYRFQNVQDKMEKVKMVEERSKEFPVNRVEEKSHDIOJ KWEKSRFIGNLFLPGDGAWKQMFQSSRMLQALSPKQSPVSSPTRSRSPSRSPSTFWPLKLTSPSPSKAASASISSMSEGEDEK			
Digest Matches (Score: 40.05)			
Score = 40.020000, Rank = 14, Database = SwissProt, Accesskey = TBC14_HUMAN			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.00000Da, Enz. Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 160 409.280 1225.630 37947.000 3+ 157.852 36 10 32.200 252 - 261 LDKHNDLGWK			
Obscurin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=OBSL1 PE=1 SV=4 OBSL1_HUMAN			
MKASSGDGSGPFCFLRPPFPVVRVVSAGAEALKCVVLGEPFPVVVNEKGGQQLAASERLSFPADGAHEGLLTLAALPTDAGVYVCARNAAAGEAYAAAAVTVLEPPASDPQLQPAERLPLSPSGEGEAPVFLTGPRSQW VLRADEVVLTCRAGGLPEPTLYNEKGDMALDEVNDSSHFAIPQGRAEDGFGASLALRILAARLPDGSGVYVCARNAHGAQAGALLQVHPQPPSPADPDEAPAPVVEPLKCAPKTFVWNEKGKHAFCYVMKGPEPE IEWHGEKRLPLDPRRMLMYDRDGGVFLKVLVQAKDRGLVLCVCAARNSAGQTLASAVQLKVEPEKRLRTPRQLQDVEGREGIATVLECKVPNSRIPPTAFWFDQRLLDCKRYEQIEEGTVRLRIIHRKADDDGTLICEM RCYVDEVIRDAPPTLTPFELEKHKIDFVAHDDIPIYSSAGSDVYKIHKEAGMFPVTPQRTGISTSDIITRIVRDVYARNRLOGRYTAKELNVSFINEKRYRFQNVQDKMEKVKMVEERSKEFPVNRVEEKSHDIOJ KWEKSRFIGNLFLPGDGAWKQMFQSSRMLQALSPKQSPVSSPTRSRSPSRSPSTFWPLKLTSPSPSKAASASISSMSEGEDEK			
Digest Matches (Score: 40.05)			
Score = 40.020000, Rank = 14, Database = SwissProt, Accesskey = TBC14_HUMAN			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.00000Da, Enz. Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 160 409.280 1225.630 37947.000 3+ 157.852 36 10 32.200 252 - 261 LDKHNDLGWK			
Obscurin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=OBSL1 PE=1 SV=4 OBSL1_HUMAN			
MKASSGDGSGPFCFLRPPFPVVRVVSAGAEALKCVVLGEPFPVVVNEKGGQQLAASERLSFPADGAHEGLLTLAALPTDAGVYVCARNAAAGEAYAAAAVTVLEPPASDPQLQPAERLPLSPSGEGEAPVFLTGPRSQW VLRADEVVLTCRAGGLPEPTLYNEKGDMALDEVNDSSHFAIPQGRAEDGFGASLALRILAARLPDGSGVYVCARNAHGAQAGALLQVHPQPPSPADPDEAPAPVVEPLKCAPKTFVWNEKGKHAFCYVMKGPEPE IEWHGEKRLPLDPRRMLMYDRDGGVFLKVLVQAKDRGLVLCVCAARNSAGQTLASAVQLKVEPEKRLRTPRQLQDVEGREGIATVLECKVPNSRIPPTAFWFDQRLLDCKRYEQIEEGTVRLRIIHRKADDDGTLICEM RCYVDEVIRDAPPTLTPFELEKHKIDFVAHDDIPIYSSAGSDVYKIHKEAGMFPVTPQRTGISTSDIITRIVRDVYARNRLOGRYTAKELNVSFINEKRYRFQNVQDKMEKVKMVEERSKEFPVNRVEEKSHDIOJ KWEKSRFIGNLFLPGDGAWKQMFQSSRMLQALSPKQSPVSSPTRSRSPSRSPSTFWPLKLTSPSPSKAASASISSMSEGEDEK			
Digest Matches (Score: 40.05)			
Score = 40.020000, Rank = 14, Database = SwissProt, Accesskey = TBC14_HUMAN			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.00000Da, Enz. Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 160 409.280 1225.630 37947.000 3+ 157.852 36 10 32.200 252 - 261 LDKHNDLGWK			
Obscurin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=OBSL1 PE=1 SV=4 OBSL1_HUMAN			
MKASSGDGSGPFCFLRPPFPVVRVVSAGAEALKCVVLGEPFPVVVNEKGGQQLAASERLSFPADGAHEGLLTLAALPTDAGVYVCARNAAAGEAYAAAAVTVLEPPASDPQLQPAERLPLSPSGEGEAPVFLTGPRSQW VLRADEVVLTCRAGGLPEPTLYNEKGDMALDEVNDSSHFAIPQGRAEDGFGASLALRILAARLPDGSGVYVCARNAHGAQAGALLQVHPQPPSPADPDEAPAPVVEPLKCAPKTFVWNEKGKHAFCYVMKGPEPE IEWHGEKRLPLDPRRMLMYDRDGGVFLKVLVQAKDRGLVLCVCAARNSAGQTLASAVQLKVEPEKRLRTPRQLQDVEGREGIATVLECKVPNSRIPPTAFWFDQRLLDCKRYEQIEEGTVRLRIIHRKADDDGTLICEM RCYVDEVIRDAPPTLTPFELEKHKIDFVAHDDIPIYSSAGSDVYKIHKEAGMFPVTPQRTGISTSDIITRIVRDVYARNRLOGRYTAKELNVSFINEKRYRFQNVQDKMEKVKMVEERSKEFPVNRVEEKSHDIOJ KWEKSRFIGNLFLPGDGAWKQMFQSSRMLQALSPKQSPVSSPTRSRSPSRSPSTFWPLKLTSPSPSKAASASISSMSEGEDEK			
Digest Matches (Score: 40.05)			
Score = 40.020000, Rank = 14, Database = SwissProt, Accesskey = TBC14_HUMAN			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.00000Da, Enz. Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 160 409.280 1225.630 37947.000 3+ 157.852 36 10 32.200 252 - 261 LDKHNDLGWK			
Obscurin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=OBSL1 PE=1 SV=4 OBSL1_HUMAN			
MKASSGDGSGPFCFLRPPFPVVRVVSAGAEALKCVVLGEPFPVVVNEKGGQQLAASERLSFPADGAHEGLLTLAALPTDAGVYVCARNAAAGEAYAAAAVTVLEPPASDPQLQPAERLPLSPSGEGEAPVFLTGPRSQW VLRADEVVLTCRAGGLPEPTLYNEKGDMALDEVNDSSHFAIPQGRAEDGFGASLALRILAARLPDGSGVYVCARNAHGAQAGALLQVHPQPPSPADPDEAPAPVVEPLKCAPKTFVWNEKGKHAFCYVMKGPEPE IEWHGEKRLPLDPRRMLMYDRDGGVFLKVLVQAKDRGLVLCVCAARNSAGQTLASAVQLKVEPEKRLRTPRQLQDVEGREGIATVLECKVPNSRIPPTAFWFDQRLLDCKRYEQIEEGTVRLRIIHRKADDDGTLICEM RCYVDEVIRDAPPTLTPFELEKHKIDFVAHDDIPIYSSAGSDVYKIHKEAGMFPVTPQRTGISTSDIITRIVRDVYARNRLOGRYTAKELNVSFINEKRYRFQNVQDKMEKVKMVEERSKEFPVNRVEEKSHDIOJ KWEKSRFIGNLFLPGDGAWKQMFQSSRMLQALSPKQSPVSSPTRSRSPSRSPSTFWPLKLTSPSPSKAASASISSMSEGEDEK			
Digest Matches (Score: 40.05)			
Score = 40.020000, Rank = 14, Database = SwissProt, Accesskey = TBC14_HUMAN			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.00000Da, Enz. Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 160 409.280 1225.630 37947.000 3+ 157.852 36 10 32.200 252 - 261 LDKHNDLGWK			
Obscurin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=OBSL1 PE=1 SV=4 OBSL1_HUMAN			
MKASSGDGSGPFCFLRPPFPVVRVVSAGAEALKCVVLGEPFPVVVNEKGGQQLAASERLSFPADGAHEGLLTLAALPTDAGVYVCARNAAAGEAYAAAAVTVLEPPASDPQLQPAERLPLSPSGEGEAPVFLTGPRSQW VLRADEVVLTCRAGGLPEPTLYNEKGDMALDEVNDSSHFAIPQGRAEDGFGASLALRILAARLPDGSGVYVCARNAHGAQAGALLQVHPQPPSPADPDEAPAPVVEPLKCAPKTFVWNEKGKHAFCYVMKGPEPE IEWHGEKRLPLDPRRMLMYDRDGGVFLKVLVQAKDRGLVLCVCAARNSAGQTLASAVQLKVEPEKRLRTPRQLQDVEGREGIATVLECKVPNSRIPPTAFWFDQRLLDCKRYEQIEEGTVRLRIIHRKADDDGTLICEM RCYVDEVIRDAPPTLTPFELEKHKIDFVAHDDIPIYSSAGSDVYKIHKEAGMFPVTPQRTGISTSDIITRIVRDVYARNRLOGRYTAKELNVSFINEKRYRFQNVQDKMEKVKMVEERSKEFPVNRVEEKSHDIOJ KWEKSRFIGNLFLPGDGAWKQMFQSSRMLQALSPKQSPVSSPTRSRSPSRSPSTFWPLKLTSPSPSKAASASISSMSEGEDEK			
Digest Matches (Score: 40.05)			
Score = 40.020000, Rank = 14, Database = SwissProt, Accesskey = TBC14_HUMAN			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.00000Da, Enz. Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 160 409.280 1225.630 37947.000 3+ 157.852 36 10 32.200 252 - 261 LDKHNDLGWK			
Obscurin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=OBSL1 PE=1 SV=4 OBSL1_HUMAN			
MKASSGDGSGPFCFLRPPFPVVRVVSAGAEALKCVVLGEPFPVVVNEKGGQQLAASERLSFPADGAHEGLLTLAALPTDAGVYVCARNAAAGEAYAAAAVTVLEPPASDPQLQPAERLPLSPSGEGEAPVFLTGPRSQW VLRADEVVLTCRAGGLPEPTLYNEKGDMALDEVNDSSHFAIPQGRAEDGFGASLALRILAARLPDGSGVYVCARNAHGAQAGALLQVHPQPPSPADPDEAPAPVVEPLKCAPKTFVWNEKGKHAFCYVMKGPEPE IEWHGEKRLPLDPRRMLMYDRDGGVFLKVLVQAKDRGLVLCVCAARNSAGQTLASAVQLKVEPEKRLRTPRQLQDVEGREGIATVLECKVPNSRIPPTAFWFDQRLLDCKRYEQIEEGTVRLRIIHRKADDDGTLICEM RCYVDEVIRDAPPTLTPFELEKHKIDFVAHDDIPIYSSAGSDVYKIHKEAGMFPVTPQRTGISTSDIITRIVRDVYARNRLOGRYTAKELNVSFINEKRYRFQNVQDKMEKVKMVEERSKEFPVNRVEEKSHDIOJ KWEKSRFIGNLFLPGDGAWKQMFQSSRMLQALSPKQSPVSSPTRSRSPSRSPSTFWPLKLTSPSPSKAASASISSMSEGEDEK			
Digest Matches (Score: 40.05)			
Score = 40.020000, Rank = 14, Database = SwissProt, Accesskey = TBC14_HUMAN			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.00000Da, Enz. Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 160 409.280 1225.630 37947.000 3+ 157.852 36 10 32.200 252 - 261 LDKHNDLGWK			
Obscurin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=OBSL1 PE=1 SV=4 OBSL1_HUMAN			
MKASSGDGSGPFCFLRPPFPVVRVVSAGAEALKCVVLGEPFPVVVNEKGGQQLAASERLSFPADGAHEGLLTLAALPTDAGVYVCARNAAAGEAYAAAAVTVLEPPASDPQLQPAERLPLSPSGEGEAPVFLTGPRSQW VLRADEVVLTCRAGGLPEPTLYNEKGDMALDEVNDSSHFAIPQGRAEDGFGASLALRILAARLPDGSGVYVCARNAHGAQAGALLQVHPQPPSPADPDEAPAPVVEPLKCAPKTFVWNEKGKHAFCYVMKGPEPE IEWHGEKRLPLDPRRMLMYDRDGGVFLKVLVQAKDRGLVLCVCAARNSAGQTLASAVQLKVEPEKRLRTPRQLQDVEGREGIATVLECKVPNSRIPPTAFWFDQRLLDCKRYEQIEEGTVRLRIIHRKADDDGTLICEM RCYVDEVIRDAPPTLTPFELEKHKIDFVAHDDIPIYSSAGSDVYKIHKEAGMFPVTPQRTGISTSDIITRIVRDVYARNRLOGRYTAKELNVSFINEKRYRFQNVQDKMEKVKMVEERSKEFPVNRVEEKSHDIOJ KWEKSRFIGNLFLPGDGAWKQMFQSSRMLQALSPKQSPVSSPTRSRSPSRSPSTFWPLKLTSPSPSKAASASISSMSEGEDEK			
Digest Matches (Score: 40.05)			
Score = 40.020000, Rank = 14, Database = SwissProt, Accesskey = TBC14_HUMAN			
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.00000Da, Enz. Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta			
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence			
MSMS 160 409.280 1225.630 37947.000 3+ 157.852 36 10 32.200 252 - 261 LDKHNDLGWK			
Obscurin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=OBSL1 PE=1 SV=4 OBSL1_HUMAN			



Spectrum Analysis Report

Date: 10/11/2011 Time: 13:49

FileName: H:\Bruker-II_F-disk\Stephie\080527\Probe48_2h_BA3_01_924.d\Probe48_2h_BA3_01_924.mgf

Digest Matches (Score: 39.40)

Score = 39.400000, Rank = 18, Database = SwissProt, Accesskey = MD1L1_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 68 733.550 733.336 23718.000 1+ 291.881 76.20 28.400 117 - 123 EAGAEKK

MSMS 89 581.410 1161.604 214819.000 2+ 179.472 82.39 29.400 521 - 529 MLEAQLERR 1: Oxidation (M)

Rat guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1 OS=Homo sapiens GN=RGL1 PE=1 SV=1 RGL1_HUMAN

MKLWQAKMSSIQDWGEVEEGAVYHVTLKRVQIQQAANKGARWLGVEGDQLPPGHTVSQVETCKIRTIKAGTLEKLVENLLTAFGDNDFYIISIFLSTYRGFASTKEVLELLLDYRGNLTSPNCEEDGSGSSSES KM
VIRNATASILRAWLDQCAEDFREPHFPCLQKLLDYLTRMMPGSDPERRAQNILLEQFQKQEVETDNGLPNTISFLEEEEELEGGESAEFTCFSEDVLAELTYMDAQLFKVVPVPHCLGCIWSRRDKKENKHLAPTIT
RATISQFNTLTKCVVSTILGGELKTQQRAKITKWINIAHECRLLKWFSSLAATVSAQSNSITRLKKTAAVPRDRMLMPEELSDIFSDHNNHTSRELLMKQTSKFNLDSSVKENQKRTQRRLQKQDWVYQ
GTVPYLTGTFLDITMLDTAQDYIEGGLINFEKKRRFEVIAQIKLLQSACNSYCMTPDQKPIQWFORQOLLTEESYALSCEIEAADAATTSFKPRKSMVKRLSLFLGSDMTSPPTPTKEQPKSTASGSGESMD
STVVSSESNHSEAEESGITPMDTPDEPQKKLSESSSSSCSIHSDMTNSSGMSLLINPLSPSPSCNNNPKIHKRSVSVTSITSTVLPVYVYNNQNEEDTCIIRISVEDNNGNMYSIMLTSDQKTPAVIQRAMLKHNLD
DPAAEYELVQVISEDKELVTPDSANFVYAMNSQVNFDFILRKKNMEEQVKLRSLRSTSLTPRTAKRGCSNRRSKITL

MW:86646.270

Digest Matches (Score: 39.11)

Score = 39.110000, Rank = 19, Database = SwissProt, Accesskey = RGL1_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 56 526.140 1051.418 24431.000 2+ 138.591 34.39 27.500 178 - 186 MPPGSDPER 1: Oxidation (M) 2: Oxidation (M)

SNW DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 1 OS=HOMO SAPIENS GN=SNW1 PE=1 SV=1 SNW1_HUMAN

MALTSFLPAPTQLSQDQLEAEKARSQSRQTSLSVSRREPPPYGRKGWIPRLLEDGFGGAPPEIHVAQYPLDMGRKKMSNALAIQVDSEGIKYDAIARQGSKDKVIYSKYTDLPVKEVMNADDPDLQRPDEE
AIKEITEKTRVALEKSVSQVAAAMPVRAADKLAPAQYIRYTPSQQGVAFNSGAKQVIRMVEMQDPMPEPRFRINKKIPRGPSPAPVMHSPSRKMTVKQQEWKIPPCISNWNKAGVTIPLDKRLAADGRGLQ
TVHINENFARLAELALYIADRRKAREAVEMRAQVERMAQREKEHEKLEMAQARERKAGIKTHVEKEDGEAREDEIRHRRKERQHDNRNLSRAAPDKRSKLQRNENRDISSEVIALGVPMFRTSNEVQYDQRLFNQ
SKGMDSGFAGGEDETYWYDQAWRGRDMAQSIYRPSKNLDEKMYGDDLEARIKTNRFVDPKEPFGSGDRQRGREGPVQFEEDPFGLDKFLLEAKQHGGSKRPSDSRPFKEHEHGGKRRKE

Digest Matches (Score: 38.42)

Score = 38.420000, Rank = 20, Database = SwissProt, Accesskey = SNW1_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 132 575.360 1149.612 145795.000 2+ 87.828 261.38 31.200 196 - 204 VIRMVEMQK 4: Oxidation (M)



Spectrum Analysis Report	
Date: 10/11/2011 Time: 13:52	
FileName: H:\Bruker-II_F-disk\Stephie\080527\Probe48_ON_BB1_01_930.d\Probe48_ON_BB1_01_930.mgf	
KYDNSLKIISNASCTTNCLAPLAKV1HDNFGIVEGLMTTVHAITATQRTVDGPGSKLWRDGRGALQNI1PASTGAAKAVGVIPELNGKLTGMAFRVPTANVSVDLTCRLEKPAKYDDIKKVVQKASEGLGKILGYTEHVVSSDFNSDHSSTFDAGAGIALNDHFVKLISWYDNEFGYNSRVVDLMARHASKSE	
MW:36030.400 Digest Matches (Score: 54.78) Score = 54.780000, Rank = 7, Database = SwissProt, Accesskey = G3P_HUMAN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz. Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_57.12.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence MSMS 203 706.370 1411.790 69820.000 2+ -41.256 1055.54 34.478 201 - 215 GALONIPASTGAAK UNCHARACTERIZED PROTEIN C3ORF19 HOMOLOG OS=MUS MUSCULUS PE=2 SV=1 MORRKKPLDVTAASSLVDLKAELFRKQEEFKQEKLLKDSGVFGKPTINKKPS1WSKQAGVTSRAEKDABQKLEEQRTLOKAREKLEEKAKLYEKMTKGOFLDEEVEDMYLVDTQK1IVKRKEMEVLGATRESQIEEERDDDDKEEFGSDK1IPPQDPSSEWVDVDSLGRSRRCMRKDPLSLLEMDKNLQKRLPVSANETKLLSEDMRKELQRQWEEEREALKMPMG1IHYEDIENEARQLGVGYFAPARDKELNRKQMKLTLEMRQTTDQR1KBNBTKIKKRAKMLEALAKLRQKMKSKEDOTEEEGREADGVVPESEFPKVPAPAPVAQNSKEV1I1QERRDTKPGVPHIREWDGRGDFSFGFWSRQSELRARERDFEFPAPSNFVFGQKRTAPHSSQPQSRPGSAPSLGHSSQSGQSPSSSTSTPASSESPQAPTVTFQTLLDDMI1STYKQVT	
Digest Matches (Score: 51.15) Score = 51.150000, Rank = 8, Database = SwissProt, Accesskey = CC019_MOUSE Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz. Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_57.12.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence MSMS 96 575.330 1149.593 242152.000 2+ 51.464 81 51 30 497 123 - 132 KMEVELGATR 3: Oxidation (M) THROMBOSPONDIN TYPE-1 DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 7A OS=HOMO SAPIENS GN=THSD7A PE=1 SV=3 MGLQARRNASSGRGAAGPRKGVQLQLPLPLPLLLLLLRPGAGRAAAQGEAAPTLYLWKTVGWRCMGDEGCPGGIUTRAVWCAHVEGWTLHTNCKQAEFPNNQNCFKVCDNHKELXMRLLGPNRNCQOPV1SKSLEKPLECTIKGEIGI1QREJACTQKMDIPADIEICEYEPKPLLEQAQL1PQQDCIVSEPSAWSECSKPCSCGLQHRTRHVVPQPOGSGSCPNTLETQVCGSSPCAELRYSLHVGWPSTCSPHRSQVQOARRRKGKMKEREKDRSGVKDPEAREL1KKKNNRNRQNRQENYWD1QIGYQTVREVMC1NKTGKAADLSFCQEQELPMTFOSCVITKECQVSESWSEWSPCSTKCHDMVSPAGTVRTRT1ROFF1IGSEKKECPFEFEKEPCLSDQGDVVPCATYGVNRTTEWTECRVDPLLSQQDKRRGNQTA1LCCGGIQTREVVYQANENLLSGLSHRNEKASKPMDLKLCTGPI1PNTTQLCH1PCPTCECVSPWSAGSGCTYENCNDQQQKGFKLKRR1ITNEPFGGSGVTGNCPHLL1EA1PCEEPACTYDKAVRLGDCEPDNGKECGPTQVQVEVVCINSDEEVEDRDLCDRA1FF1PVACDAPCPKDCVLSTWSTWSSCSHTCSGKTTGKQ1IRARS1LAYAGEEGGICRPNSSALQEVRSNC1EHPTCYVHWGTGPGQCTIEDTSVSSFN1TTTWMGABSCSVGMQTRV1ICVRNVGVQGVKPKCPBSLRTVTRVRLCLPCRKDC1VTPYSDWTSCPSCKEGSDS1IRKQSRHHV1IQLPANRGDCTDPL1YERAKCEAPQACQYVNWKTHWRBCLQVPVWSQDQSPQAQEGCGCPQGRAR1TCRRQDQQAQ1HECLQYAGVPALTQAQ1PCQDDCQLTWSKSPSCNGDCQAVTRRKL1VGRSKKKECKKNSHL1PL1ETQYCPCKYNAOPVGNWSDCL1PEKGVVLLGMKRVQCD1KECQCGYRYQAMACVQDQNGRLVTSRCSNHSYG1IEAC1PCPSCDCKLSEWSNHSRCSKSCSGSVKRSKWLREKPYNGGRCPKLDHVNQAQVYEVVPCHSDCNQVLMTPEFVSICKVTFVNMREKCEGQVQTRKVRCHQNTADGPESEHVEDY1LCPDEMP1LGRSVCKLPCPEDCV1SEWGWTCQV1PCNQSSPFRQSRADP1RQPADGERSCPNAVEKEPCNLKNCNHYD1VNTDWSQC1SEKAVGCNGIKTRMLDCVRSRSGSVLDYK1CEALGELKNWQMTSCMVCEPVCNQLSDWSVNSCSQTCGLTKM1RRTVTQ1PQGGDGRPCPLMDQSKPCPVKPCYRWYQWSPQCVQEAQCCEGTRTRN1ISCVVDSGSAADFPKVDDEFCAD1EL1IDGNKNMVLSESCSQPCPGCYLKDWSWSLQCLTCVNGEDLGGG1QVRSRPV1I1QELNQHLC1PEQMLTEKSCYDGDQCYKYKWHASAWKSSSTWCQRSDG1INVTGGLCYHMQPDAHRSCHN1PSCPSHSTSEKTKCEGTEYVMSNS1LQCCTL1PVVVLPTMEDKRGDVKTSRAVHP1QPSNPAGRGWTF1QFPFGDRLK1TVWGVGAAGFVLL1F1VSM1YLACKFKPKQRKQNNRLKPL1LAYDGDADH	
Digest Matches (Score: 48.13) Score = 48.130000, Rank = 9, Database = SwissProt, Accesskey = THS7A_HUMAN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz. Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_57.12.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence MSMS 147 513.351 1025.610 55032.000 2+ 81.897 33 13 32 426 742 - 751 VNVGQVGPKK MSMS 96 575.330 1149.495 242152.000 2+ 136.711 70 48 30 497 1116 - 1125 ENCGEGVQTR 3: Carbamidomethyl (C) Elongation factor 1-alpha 1 OS=Bos taurus GN=EEF1A1 PE=2 SV=1 EF1A1_BOVIN MKKXKX1IN1V1GSDVSGST1TGHLL1YKQD1DKDPT1EKEFEAAEHWGSGFPYANWLDL1KAEERGIT1D1SLMKPFTSKYXYV1I1DAPGHRDF1KNNM1TQTSQADCAVL1VAAGVGEFEAGISKNGQ1TREHALLAYTLGVKQL1VGNKMS1TEPPYSGKRYEE1IVKEVSTY1IKK1IGNYPT1FAVPI1SGWNGDNMLPEPSANMPF1GWKVT1RKDGNASGTT1LEALDC1LPPTRPTDK1PLRL1PQDVY1KGGIGTV1PVGVR1ETGVLKPGMVVTFAPVNV1TEVKS1VEMHEALSEAL1PQDNVGF1NMVSVKVDVRRGNVAGDS1KNDPMEAAAG1TAQV1I1LNHPQ1ISAGYAP1VLDCHTA1H1ACKFAELKEK1IDRRSGKLEDDK1FKLKGDA1AVDMV1PGKPMCVES1FSDYPL1GRFAVRDMRQ1TAVGV1KAVDKKAAGAKVTK1SAQKAQKAK	
MW:50109.110 Digest Matches (Score: 47.89) Score = 47.890000, Rank = 10, Database = SwissProt, Accesskey = EF1A1_BOVIN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz. Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.2.06, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_57.12.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence MSMS 147 513.351 1025.610 55032.000 2+ 81.882 43 47 32 426 256 - 266 IGGIGTVPVGR Heat shock-related 70 kDa protein 2 OS=Homo sapiens GN=HSPA2 PE=1 SV=1 HSP72_HUMAN MSA8GPA1IGLDG1TYS1CVGVFQHGVE1IANDQGNRT1PSYVAFD1TERL1GDAKNAQVAMNP1TTFDAKRL1GRKFEDATVQSDMKHWPFRVSVSEGGKPKVQVEYKGTXTFFPEE1ISSVMTKMKIEAEAYLGGKVHSAV1TVPAYFND5ORQATKDAGT1TGLNVL1R1INEPTAA1ATGLDKKGCAGGENV1LPDLGGTTFDVS1L1TEDG1FEVKS1TAGDTHLGGEDFDNRNMVSHLAE1FFKRKHK1D1GPNKRAVRRLR1TACERAKRT1ASSSTQAS1E1DSEVDDVPT1STRARFEL1AAD1PRTLE1PEKALRDAN1DKRG1QEV1VVGST1R1FK1OKLLQDF1NKGKELKS1INPD1AYAYGAAN1QAAL1IGDSESNVD1LLD1VTPLSLG1IETAGGVMTPL1KRN1TTP1TKTQGT1TPTTYDQSS1VLVQVYEGERAMT1KDNLL1GRFLD1TG1PAPRGVQ1IEVTF1IDANGL1NVA1TAA1DSTK1RKN1T1IT1NDGRGLSKD1IDRW1QEAERKY1SEDEAN1DRVAA1NALES1YTYNI1KQTV1DEK1RLK1G1SEQDN1L1DKQ1QEV1NWLDR1NMAEK1DEYEHQK1ELERV1CNP1ISK1LYQG1GGGSGGGGSGAGSGPT1EEVD	
MW:69977.870 Digest Matches (Score: 127.06) Score = 127.060000, Rank = 1, Database = SwissProt, Accesskey = HSP72_HUMAN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz. Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence MSMS 310 830.400 1659.895 234236.000 2+ -25.587 17418 127 38.200 173 - 188 INNEPTAA1AJYGLDK MSMS 375 1077.610 3251.522 457769.000 3+ -218.807 29 17 40.200 605 - 630 VCNPSK1LYQGGPGGGSGGGSGAGSGPTIEVD 2: Carbamidomethyl (C) Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A PE=1 SV=1 TBA1A_HUMAN MRECI1SH1VGQAGV1IGNACWELCYL1EHLG1QPDQMPKSD1TK1GGDDSFNT1FSETGAGKHV1PRAVFD1LEPTV1DEVRTGT1YRQLF1HPQL1GTKEADAANN1YARGHYT1IGKE1I1DLVLD1R1RLADQCT1GLQGLFV1HSPGGT1SGSFT1LLMERL1SVDYGKKSLFES1Y1PAPQVSTAV1VEFYNS1L1TTH1LEHSD1CAP1MVDNEA1YD1ICRNL1D1ER1TYTN1NLRL1Q1QVSS1ITAS1LR1FDGAL1NDVLT1FEQTN1LV1PY1PRIH1FLAT1YAPV1SAEK1AYEQL1SVAE1TNAC1FEPAN1MKVCD1PRHGK1YACCL1LYRGD1VVPKDVNA1AT1IKTR1RT1QFVDW1CPT1GFRK1GV1NG1QPTV1VPGDL1AKVQRA1VCHL1SN1TTA1EAWAR1L1DH1FLM1YAKRA1FVHW1V1GEGME1EGFSEAR1EDHAAL1EKD1VEGV1DVSVEGEEGEEY	
MW:50103.610 Digest Matches (Score: 89.84) Score = 89.840000, Rank = 2, Database = SwissProt, Accesskey = TBA1A_HUMAN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz. Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence MSMS 404 851.380 1701.906 27555.000 2+ -89.991 139 89 41.300 65 - 79 AVFVDLEPTVIDEVR HIRA-interacting protein 3 OS=Homo sapiens GN=HIRIP3 PE=1 SV=3 HIRP3_HUMAN MARKEKMQEFTFR1FRRG1PDL1TL1HS1VRRRY1LAHSGRSH1LEPEERQALKRL1VEELLKMQVD1EAS1REDK1DL1TKGKR1PPT1PCSD1PERK1RFR1PNS1ESES1GSEASS1POY1FOP1AKNGVAA1EVSPA1KENPR1ASKA1VEES1DEERQ1RDL1PAQ1KESS1EEEEKYK1RRK1PVV1KQAP1CRAS1VRK1ARRES1E1AB1PQ1TAKK1VEON1KOT1SLK1SE1QES1EE1LAQK1QRRE1VEE1EKEED1EKG1W1PR1KRS1NRK1SAR1E1SC1KQK1QAKRL1GDS1DEE1EQKEA1ASGDD1SGDR1DEP1VQRK1SEDR1TL1KGGKRL1SGS1DEED1SGKGE1TAGK1SRK1MARL1GST1SGES1DLERE1VDS1EAGG1PQ1EERKNR1SSK1SRK1R1SS1SS1SS1G1PEAK1GGKA1GSGR1GDEHP1AV1RLKRY1RAC1AHRN1YK1LLGSC1SHK1RL1SL1RAEL1A1LSMK1GTP1SLGK1CRAL1KEQ1REAA1E1VAS1LDVANI1SGSGR1PRR1RT1FAN1PL1GEAA1P1GEL1YR1RTL1D1SEER1PR1PAP1PD1WSHMR1I1SSD1GESN	
MW:61919.950 Digest Matches (Score: 60.24) Score = 60.240000, Rank = 3, Database = SwissProt, Accesskey = HIRP3_HUMAN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000Da, Enz. Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence MSMS 356 500.910 1000.553 38961.000 2+ 259.439 45 7 39.600 180 - 189 QAPGKASVSR MSMS 96 575.330 1149.479 242152.000 2+ 150.985 524 60 30.500 240 - 248 EEEVEEEK Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3 G3P_HUMAN MGKVGKVGNGFGR1IGRLV1TAAFN1SGKVD1VAINDP1IDLNYVMYFQYD1THGK1FHTG1VKAENG1VLN1GNP1ITI1QERDPSK1KWGDAGAE1YVVE1STGV1TFMEKAGAH1LQGA1KRV1IASADAP1MFW1GVN1HEKYDNSLKIISNASCTTNCLAPLAKV1HDNFGIVEGLMTTVHAITATQRTVDGPGSKLWRDGRGALQNI1PASTGAAKAVGVIPELNGKLTGMAFRVPTANVSVDLTCRLEKPAKYDDIKKVVQKASEGLGKILGYTEHVVSSDFNSDHSSTFDAGAGIALNDHFVKLISWYDNEFGYNSRVVDLMARHASKSE	
MW:36030.400 Digest Matches (Score: 54.78) Score = 54.780000, Rank = 4, Database = SwissProt, Accesskey = G3P_HUMAN	



Spectrum Analysis Report	
Date: 10/11/2011 Time: 13:52	
FileName: H:\Bruker-II_F-disk\Stephie\080527\Probe48_ON_BB1_01_930.d\Probe48_ON_BB1_01_930.mgf	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 203 706.370 1411.790 69820.000 2+ -40.831 1055 54 34.500 201 - 215 GALQNIIPASTGAAK	
Transmembrane protein 209 OS=Homo sapiens GN=TMEM209 PE=1 SV=2 TM209_HUMAN	
MQGEAHPSSLSLIDRTIKMRKTEAEKMWLLAWGLLWNSMAGMIYTEMWGRLLSYVWVYPLVTELLALASLSLALPDFWRYFYKYTVAPTSLVVSPGQQTLLGLKTAVVQVTPPHDLAQTQIPPAWSPSPSIQOGS	
VLSTYSPRSSTSPSPKFTTSCMTGYSPQLQQLSSGSGSGSYSPGVTVSPVSGYNNKLSAFSPSPSPYPTTVGPVSSSGLRSYRSSPTVYNSPTDKEDYMTDLRLDTFLRSSEKQHRVKLGSPDSTSPSSSPTFWNYS	
RSMGDYATQLKKFQYQLACRSQAQPCANKDEADLSKQAAEVNAWRVAMNRQLLDHMDSWTAKFRNWIETLIVPLVQELSVSTQMRRMGCPQLQIGEASITSLKQAAVLKAPLIPLTNTIVQYLDLPNQGYLPERI	
LELSQGGCMSPFRWNRGGDFGRKQWDTLPDTSALIMHVFCYLLDSRLPPHPKYPDGKFTTSQHFPQTPNPKPDVTNENVFICYQSAINPPHYELIYQRHVYNLPGKNNMFHTLLMFYLIIRKTESGMLGRVNLGLSG	
VNLNLWIFGE	
MW:62881.470	
Digest Matches (Score: 51.67)	
Score = 51.670000, Rank = 5, Database = SwissProt, Accesskey = TM209_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 224 764.350 1527.722 54228.000 2+ -19.175 27 51 35.200 2 - 15 MQGEAHPSSALIDR 1: Oxidation (M)	
THROMBOSPONDIN TYPE 7A OS=HOMO SAPIENS GN=THSD7A PE=1 SV=4 THS7A_HUMAN	
NGLQARRNWSGSRGAAGPRRVLQLPLPLPLPLLLLLLPAGAGAAQGEAEAPTLILWKTGPMGRCMGDECGPGGIQTRAVWCABVEGWTTLHTNCKQAERPNNQNCFKVCDWHRELYDWRLGPWNQCQPIVISK	
SLERFLCTIKRGEIQVREIACIQKDKDIPADITCEYEPFKLLLEQACLIPCGQDCIVSEFSAWSECSKTCGSLQHRTRHVAPPGQSGGCPNLETFQVQCSGPCAEELRLSYLSEWGPWSTCSMPSRQVRAQR	
RGNKEREKXDRRQLPWSVQVTTGRLITCKGQIDKTIEXFERKAEAEWGRSPFVAVNGLKKAEREGITIDISLWPKFTTKYIYIIIDAPGRHDPFKNMIRGTSQADCAVLIVAAGVGEFEAGISKNQGTREHAL	
LAYTLGVQLQVGVNKMDSPEAPVSEKRYDEIVKVSAYIKIGIYNPATVPFVVISGHRDNNLESPNPFWKGNKVERKEGNASGVLSLEALDTLPTRPTDKPLRLPQDVYRIGIGITVPVGRVETGLLRPMQ	
VVTFAFVNITTEKVSVMEMHEALSEALPDNGVFNKVNVSVDIRRGNVCGDSKSDPPQEAQAFTSQVYIILNHGQISAGYSPVIDCHTAHIACKFAELKEIDRRSGKKLEENPKSLKSGDAAIVEMVPGKPMCVES	
FSQYPLGRFAVRMDRQTVAVGVKINVKKSGAGKVKTSQAQKAQACK	
MW:50438.310	
Digest Matches (Score: 47.89)	
Score = 47.890000, Rank = 7, Database = SwissProt, Accesskey = EF1A2_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 186 604.340 604.341 87497.000 1+ -2.140 19 11 33.900 444 - 450 KSGGAGK	
MSMS 147 513.350 1025.610 55032.000 2+ 80.516 43 47 32.400 256 - 266 IGGITVPVGR	
Cordon-bleu protein-like 1 OS=Homo sapiens GN=COBL1 PE=1 SV=2 COBL1_HUMAN	
MCGRAEAAASSTRTGREGQAVTRLGAGARAAPRAMDGRTPRPDAPARRKPKAKALPFAETKTYDVSAAADSVESTAFIMEQKENMIDKDVLSVVLPGDIIKSTTVHSGSKPMMDLIFLCAQYHLNPSYTI	
DILLSAQNHIIKFKPTPIQMLVEYKVLKPKMLDKKPTPIPIPEKTVRVVINFKTKQTVIRVSPHASLQELAPIICSKCEFDPLHTLLKDYQSQBELDLTRSLNDGLRELAMDVNREKQISQNDIMKKEKNK	
QFFSFPQSKKKRQTSAPAPLTILVWHRPTFRSNTIISKPIYSLTSPDAKKRRALPPMDASQSPQDLAHQERFASCTIVKSWVDKTSRSCPEAGRVRAAGLQLSSMSAGNSLARTKRAKAPSPSKIPPHQS	
DENSRVLTALQPDVGPDSASAEANSPEELSPETHFPLGSLSQEQCTAPKLMEETSVFPCPTPEAAITSLTSGISSDYSLIEDERKEELSVEVPKVEANISPKSQDIPFVSTDIINTLKNDDPSALGNGSGEFSQNSM	
EEKQETKTDGQGEPPSHVYDTSNGKGVDSIRNLKSLGPNQENVQNEIIVYPENTEDNNKNVGKKTENVEVGAKNNNIDMEVERPNSNEAHTDTAISYKENHLAASSVPDGKLNQSPSAEKTDAAIQTTPSCNSFD	
GKHQDHNLSLQKVEECVQTSNNITSTQBSCLSDQSQVNTSREFRSQGTLTIHSEDLPTVKDPICAHNDLPLPVDRIDKNSTASYLKNYPLRYQDYNPKPKSPNEITREYIPKIGMTTYKIVPKSLEISKDQWSET	
IETKDDQMDHLAGKRTHEYNKETAQTEDSALISSEPEELPNLKPKPNLRTBEHQVSPSVSPSDAMVSLPKAPKMTROTGTAPFANLEEIINNILESKFRASNAQAQKPSFPLQMQRVSGHYTSSAAKSHVA	
APWPAKELDNKREOMLPRPELISLKMMSVSPVPLVEKDDTQIQDAPEAPETPIAPASQVSTQRLKTTGAPRPVSSGSPFALAVVRSGQSFKERTESPASALVQFPANTEGKTHSVH	
FVFDIPQLGVSDKENNSANNEQNSQIPTPTDGPSTFVMRQSLTFQSSDPQMRQSLLTAIRSGAAALKRVTIPGNTISVNGRSLSRHNSPDAQDGH	
MW:131705.140	
Digest Matches (Score: 46.06)	
Score = 46.060000, Rank = 8, Database = SwissProt, Accesskey = COBL1_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 311 698.420 1395.686 53802.000 2+ 105.015 46 46 38.200 654 - 666 ENHLAASSVPDGK	
Extracellular leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=ELFN1 PE=2 SV=1 ELFN1_HUMAN	
MAGRGWALMVCAATLLRHAGLAADCVLIEGQGFVWLATCSQNNQFYELIIPQISNTIVDLRLMRNRSYQVLSLSPGNETYLMILNLTNETYIEDGAFSGQPLQVLQCYGNLRLTEGMLRGLQKLEVLY	
LQANLIEVVMSSFPWPCINVINIDLSMNRIOQLNSGCTFAGLAKLSVCELYSNPFYCSCELLGLFLRWLAFTNATOTYDRMQCESPPVYSGYLLQOGRGRHRSLSKLQSVCTEDSYAAEVGVPGRVETGLLRPMQ	
PPPPFPPEPDMFADCCDSQDGTTPFLVALPTAQAEARPLIKVKQLTQNSATITVQLPSPFFHMYLLEHFNNSKASTVSRLTKAQEEILRLNLTFLTNITYTCVVSTASGLRHHNCTLTICPLRPLSPPPGSPVPSPT	
ATHYIMTILGCLQGMVILGVAVYCYLRRRRRQEKHKKAASAAAGSLKTTIIEKLYGPELEAPGLAYLSQGPLLGEPAVTRIPYLPAAGEVEQYKLVESADTPKASGSGSYMESSVAEISTIAKEVDKVNQIINNID	
ALKSESTSPQGVGSGPVSAEPPVLLSPLEAKRGFLAPQYDAFGHSLQRHHSVEAAGFPRASTSSGQSVRSAPRAFRAEAVGVHKAASAAEAKYIEKGSFADAILTVTFAAVALRAEAKRGYQGEHRHSYPSGSP	
AEPFAPPQPPPPFPHGELGRKASILEPTIRKPRDLAYSQLSQYHSLSYSSSPSYTCRASQSWIERFLSRHRKKEEFPMAAGLAKRKYQFAKDEDLIDLDYKGVSAQHS	
MW:88001.870	
Digest Matches (Score: 42.55)	
Score = 42.550000, Rank = 9, Database = SwissProt, Accesskey = ELFN1_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 103 523.250 1045.600 45698.000 2+ -102.685 51 42 30.700 452 - 463 KAASAAAAGSLK	
CHOLINE-PHOSPHATE CYTIDYLTRANSFERASE B OS=HOMO SAPIENS GN=PCYT1B PE=1 SV=1 PCY1B_HUMAN	
NPVVTDAESBTGIPKLSGNEPPSTEEIEHTCPQPLTLTAPAPFADETNCCQAPHEKLTIAQAKLGTPADRPVVRVADGIFOLPFRSGHARALMQARTLFPNYSLLVGVCSDDLTHKFGKFTVMNEAREYALRH	
CRYDVEIRDAFWTLTPELKKHIDFVABDDIPYSSAGSDVYHIIKEAGNVPTQRTGETISTDIITKIVRQDVYVARNRLQGYAKELINVSFINEKRYRFQMGVDKMKKVKVMVEERSKSEFVRNVEKSHDLIQ	
KNEKESREFIKNLELPGDGAQWQMFQERSSRMLQALSPKQSPVSSPTRSRSPSRSPSTFSWLPLKTSPPSSPKAASASISSMSEGEDEK	
Digest Matches (Score: 40.38)	
Score = 40.380000, Rank = 10, Database = SwissProt, Accesskey = PCY1B_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 96 575.330 1149.590 242152.000 2+ 54.748 48 40 30.500 262 - 270 EFVNRVEEK	
SNW DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 1 OS=HOMO SAPIENS GN=SNW1 PE=1 SV=1 SNW1_HUMAN	
NALSTFLPAPTLQDOLDAEKASQSRQTSYLSRREPPFYQIRKWIIPALLEDFDGGGAPZIEHVAQYPLDMGRKKMSNALIAQVDSGKIKYDAIARQOGSKDKVYISKYDTLVPKEVHMADDDLPQRDEE	
AIKETEXTKVALKESYKGVAAAMPVRAADKAPAQYIRYTPSQQGVAFNSGAKQVRIRWVEMQKDMPEPPRFKINKKIPRGPPSPAPVNHSPSRKMTYKEQGEWKIPCTISNWNKAGYTIPLDKRLAADGRGLQ	
TVHINTEKPLALEALYADRKAEAVEMRAQVERKMAQKEKEKEHEEKLREMAQKARERRAGIKTHVEDEGEARERDEIRHDDRKEQDHRNLSRAAPDKRSKLQRNENRDISVIALGVPNRTNEQVYDQRLFNQ	
SKGMDSGFAGEDETYINVYDQAWRGKDMAQSYIRPSKNLKDXYGGDLEARKITNRFVDPKEFSGSDRRQGRGREGPVQEEPDFGLDKFLLEAKQGGSGSKRPSDSSRKEHEHEGKKRRKE	
Digest Matches (Score: 40.38)	
Score = 40.380000, Rank = 10, Database = SwissProt, Accesskey = SNW1_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	



Spectrum Analysis Report

Date: 10/11/2011 Time: 13:52

FileName: H:\Bruker-II_F-disk\Stephie\080527\Probe48_ON_BB1_01_930.d\Probe48_ON_BB1_01_930.mgf

TVDCCQGGANGDIASLSIVAGDLLQCFRTVRSFPGSKEYKVKAIIGGIDWDSPFGYNLTQAKDKGTPOQFSSVKVIHVTSPQFKAGPVKFEKDVYRAISEFAPNPTPVVMVKAIIPAYSHLRVYFKSTPGKAKFSLN
YNTGLISILEPVRKQQAHEFLEVTYSDRKASTKVLVVLGANSNPPEPTQATYKAADFENVPVIGTVMLSAVDPDEGENGYVTSIANLHVFPFADIHFTGAVSTSENLDYELMPRVYTLIRASDWGLPYRREVE
VLATTLNNDNTPLEKINCEGTIPRDLGVGEQITVSAIDAGELQVQIEAGNELFFSLNPNAGSGLSKRSLMDGLGARVFSBLSRLITATDGENFATPLTINITYVAAHKLVLNQCETGVAKMLAEKLQA
KLEHNGCEVEDIPFDSSHVNAHLPQFBSLPTGLQVEMQPVGSVIFMNSTDLOTFKGLVYAVSGGNEDESCPMIDMETQKALISPLDRESTDVYTLATVYDLGIDPQKAAWLLHVTVVDANDNPBEZQESVF
VEVSEDKVEHSEIIQVEATDKDLGPNGVITYIVTDITFSDISVGVNVIARPLDRELQHEHSLKIEARDQAREEPQLFSTVVVKVSLDVDNDNPPTPIPNNYRVKVRDLPECTVIMMLEAHDPLGQSGQVRYSL
LDHGBGNFVDVKLSGAVRIVQQLDFEKKQVYNLTVRAKDKGKPVLSSTCIVEVEVVDVNNLHPPVFSFVEKGTVEKEDAPVGLSVMTVSAHDEADARRDGEIRYSIRDGSGVGVFKIGEETGVITSDRLDRESTSH
YWLTVFATDQGVPLSSPFIIEIYIEVEDVNDNAPQTSPEVPIYPEIMENSPKDVSVQVIEAFDPDSSNDKLMYKITSQNPQGFPSIHPTGLITTTSSKLDREQQDEHILEVTVDNDSPPKSTIARVIVKVLIDENDNK
PQFQKPFKILRLPEREKPRERNAREPLVHVIAATDKDEGNAEISYSIEDGNEHGKFFIEPKTGVVSSKRFSAAGEYDILSIKAVDNGRPQKSSITTLRHIEWISKPPSLEPISFSEFPPTVMEBDDPAVHMLGVI
SVEPPGILPAMFDTGGVYDSHFDDVKGOTIIVAKPLDAEGRKXNVLVEATDCTTILQVFTIIVIDTNDHRPQFSTKVEVVEIPEDTAPETTELQISAVDQDEINKLITYIQSSRDLSLAKFLDPATGSLITSE
KLDHEAVBOHTLTVMVRODQVPVKNRFARIVVNVSDTNDHAPWFTASSYKGRVYESAAVGSVVLQVATLDDKDKNAEVLVYSIESQNIQNSFMDPVLGSLITAKELDRSNQAEYDLMVKATKDGSPMSBITSVRI
VTIADNASPKFTSKESYSELSETVYSIGSFVGMVTAHQSQSVVVEIKDGTGDAFDINPHSGTIIQKALDPETLPIYTLIIQGTNMAGLSTNTTVLHVLDQENDNAPVFMQAEYTGILISESASINSVLTDNRNVLVI
RAADAKDSNALLVHIVEPSVHTYFAIDSSTGAHTVLSLDYEETSIFBFTVQVDMGTPLRFAEYANVTVHVVIDINDCPPVFAKPLYEASLLPTVKGKVVITVNMATDADSSAFSQLIYSITBEGNIEKFSMDVK
TGALTQVNTTQLRSRYELTVRASDGRFAGLTSVKINVKESKESHLKFTQDVYSAVVKNSTEAETLAVITALGNPINEPLFYHILNPDRRFKISRTSGVLSTGTPTFREQQEAFDVVVVEVEBHPBAVAHVVRVVI
VEDQNDNAPVFNLPYVAVKVDVTEGVHIVRTAVORDSGRNGVHYTLKEHHEHPQIGPLCEISLKKPELOTLANKELYTVVAKOGGNAPASAEVIVPTVVMKAMPVEFPFSAEIASIQVHSPVVVQANS
PEGLKVFYSITDGDPPFOPTINFNNTGVNVIAPLDPEAHAPYKLSIRATDSLTCGAHAEEVFDIIVDDINDNPPVFAQGSYAVTLSEASVIGTSVVQVRAVTSDSSEPNRNGISYQMGHNSKSHDFHVDSTGLISLLR
TLDIYQSQRHTIFVRAYDGGMPTLSSDVIVTVDDTLNDNPPLEFQOIEARISEHAPHGHFVTCVKAYDADSSDIDKIQVLSILSGNDHGHFVIDSATGIITLNLHRRHALKPFYSINLNSVDGVFRSTQVHVTVIG
GNLHSPAFQLQNEYEVELAENAPLHTLMEVKTDDGSGIYGVHTYHIVNDFAKDRFIINERGOIFTEKLDRETPAEKVISVRLMAKDAGGKVAFCVNVILTDNDNAPQFRATKYEVNIGSSAAKGTSSVVKVLASD
ADEGNSADITYAEADSESVENKLEINKLSGVITTKESLIGLENEFFTFVRAVDNGSPKESVVLVVKILPPEMQLPKFSEPFYPTVSEDVPIGTEIDLIRAEHSOTVLYSLVKNPTESNRDESFDIDRQSGRL
KLEKSLDEHTTKWYQFSLAKCTQDDHEWASVDVYSIQVQDANDNSPVFSESPIEAFIVENLPGSSVQIRASDADSGTQVWVSLDQSGSVESIEFANMETGWITTLKELDEKRDANYIKRVASDHERIQ
SSTAIVDTVTDVNDSPPRFTAEIYKGTVESDDPQCGVIALISTDADSEIINQVITYITITGDPFLGQPAVETIQNEWKVVVKPLDREKRDNYLLITATDGTFSKALVEVVKVLDANDNSPCKLYSDTIPEDV
LPGKLMQISATDADIRSNAEITYTLGSGAEKFKLNPDTGELKSTPLDREAEQVTHLLVRATDGGGRFQASIVLTLEDVNDNAPESADPYAITVFENTPGLTLTRVQATDADAGLNKRLLYSLIDADSGQFSI
NELSGIIQLEKPLDRELQAVTVLSKAVDQGLPRLTATGTIVISVLDINDNPVFEYREYATVSEDILVGTETVLQVYASRDIEANAEITYISIGNEHGKFSIDSKTGAVFIIENLDYESSHEYYLTVEATDGGT
PESLSDVATVNMVNTDINDNTPFSGQDTTIVTISEDVLEQSVITVMADDADGSPNSHIIHYSIIDNQSSSTPIDPVRGEVVKTKLLDRETIISGYTLTQVADNGSPPRVNTTVNIDVSDVNDNAPVFRSGNYSVILQ
ENKPVQFVSLQLVVDDESNNPPFFFTITVTDNEKAFEVNPQVLLTSALKRKEKHLLQVAVDNGKPOLSELTYIDIRVIESIPTYPAIPLFIPTSSGOEYSOGYICKHATDQDVDTLYTSLDQMDN
FLSVSTGGKLLARKKLDIGQYLNVNSVTDGKFTVADITVHIRQVTOQMLNHTIAIRFAMILTPEEFVGDVYRNFQRALNRLGVRRNDIQVLSQSEPHPHLDVLLFVEKPGSAISTKQLLHKNSSVTDIEEII
GVRLINVPQKLCAGLDPCWPKCEKVSVDSEVMSTHSTARLSFVTPRRHRAAVCLCKEGRCPFVHGGCEDDPCPGSECVSDPWEKHTCVCPSGRFGQCQSSMTLTGNSYVYKLTENENKLEMKLTNMRITYST
HAVVMYARGTDYSILEIHHGRGLQYKFDGSGGPIVSQSIQVNDGOWHALEVNNGHYARLVLDQVHTASGTAPGTITLNLNDNYVFFGHIRQGGTRHGRSGPOVNGFRGCMDSIYLNQELPLNSKPRSYAHIES
VDVSPGCLTATEDCASNPQNGQVNCNPSAGGYCKCSALYIGTHCEISVNPCCSKKPLCYGTCVVDNGFVQCQGRGLYTGORQLSPYCKDEPCKNGGTCFDSLDGAVQCQDSGFRGERCQSDIDECGNSGPNCLHGA
LCENTHGSYKCSHEFRORHCEDAPNOVSTFPMNLGLAEGIGIVPVAGILVLVVPVLCRKLSSKKKHQAEPRDKHLGPATAFIQRPFDSKLNNIYSIDPPQVVRISYTPPEIPSDSNLDRNSFEQSAI
PEHPPEFTSNFESVHGHRKAVAVCSVAPNLPFPFSPNSPDSDSIQKPSWDFDYDTKVVDLDCLSKKPLEKPSQPSYSAKESLSEVQSLSSFSQSECDNGYHWDTSWMPSPVLPDIQEPFNVEVIDETPLYSAD
PNAIDTDTYPPGGYIESDPFPPPEPDAADLEPLPEPFSQFESIHPPRDMPAAGSLGSSSRNRQRNLIQYLPNFYPLDMSEPTKGTGENSTCREPHAPYPPGQQRHFEAPAVESMPMSVASTASCSDVSACCE
VESEVMSDYSESGDGHEFVETIPLPDSQQTETV

MW:505958.070

Digest Matches (Score: 36.71)

Score = 36.710000, Rank = 17, Database = SwissProt, Accesskey = FAT1_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore R(min) Range Sequence

MSMS 326 333.470 1058.548 27534.000 3+ -143.907 7.7 38.700 2554 - 2562 LDREITPAEK

MSMS 92 622.800 1244.659 157643.000 2+ -53.532 36.36 30.300 122 - 132 ALEKNTNVEAR

MSMS 168 664.780 1992.014 410560.000 3+ 156.432 29.16 33.100 669 - 686 LVNLCQCEETGVAKMLAEK 14: Oxidation (M)

PUTATIVE FAM120A OPPOSITE STRAND PROTEIN OS=HOMO SAPIENS GN=FAM120AOS PE=5 SV=1 F120S_HUMAN

NKRKTKIDGDDTVASETFWAGSLSQSPSSVTPRRTNDRSWRRAAARGLHPRPSTLQCPARLSRARAGTRCPQRHGRATFCALGRNGIGVRRGPGQPRAPRIPGLTLTKWRKNSARRMQWAMQGTGRNQTFGGGVPLF
WWTWLTICGAVRWLSPCRLTHSCSRAPFSAPLKKTKSSMLPPKQALASAAANLRCGAGCNRQAVAGGLLPSTWLSHAGLKAEPILPVKKISRSCSVNNKSKKTKTKPPTLRSFLSPF

Digest Matches (Score: 36.65)

Score = 36.650000, Rank = 18, Database = SwissProt, Accesskey = F120S_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore R(min) Range Sequence

MSMS 224 764.350 1527.831 54228.000 2+ -90.649 28.36 35.200 174 - 188 SSMLPPKQALASAAAR

Spectrum Analysis Report	
Date: 10/11/2011 Time: 13:58	
FileName: H:\Bruker-II_F-disk\Stephie\080429\Stephie_Probe48_BC4_01_857.d\Stephie_Probe48_BC4_01_857.mgf	
GGFGPGGYGGIHEVSNQSLQLPNVKVDPETIQNVKAQEREQIKTLNNKFASPIDKVRFLFEQQNOVLQTKWELLQQMMVGRTPINLEPIFGGYIDSLKRYLDGLTAERTSQNSELNNQDLVEDYKKRYEDEINKRKTAAENDFVTLKDVNDAYNMKVLEQSKVDLLNQIEFLKVLVDABISQIHQSVTDNTVILMSDNRNLDDLSIIAEVKAQYEEIAQRSEAEALYHSKYBELQVTVGRHDSLKEIKIEISELNRVIOQLQGEIAHVKFQCKNQQVADADAEQRGEHALKDARKNLDEALQQAEDLARLDQYQELMNVKALADVEIATYRKLLEGECECRMGSQDSSNVTVSVTSSTISSNVASKAAPGGSGGRGSSGGGYSSGSSSYSGSGGRGSGSGSGGGISGGGYSGGGGGRYISGGGSGGSIISGGGYSGGGGKXBSGGGSGSGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGAFGSSVTFSPR	
MW:65393.220 Digest Matches (Score: 138.34) Score = 138.343333, Rank = 4, Database = SwissProt, Accesskey = K22E_HUMAN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore R(min) Range Sequence MSMS 190 487.250 973.531 3554948.000 2+ -39.612 259 42 28.400 394 - 401 IEISELNR MSMS 221 597.330 1193.616 711446.000 2+ 30.733 647 68 29.600 375 - 384 YEELOVTVGR MSMS 191 738.290 1475.785 5943443.000 2+ -144.115 3073 88 28.400 198 - 209 FLEOQNOVLQTK Heat shock-related 70 kDa protein 2 OS=Homo sapiens GN=HSPA2 PE=1 SV=1 HSP72_HUMAN MSARGPAIGIDLTGTYSCVGVFQHGKVEIILANDQGNRTTPSPVATDTDLRLIGDAKNOVAMNPNTTIFDAKRLIGRFEDATVQSDMKHWPFRVSSGEGPKFVQVEYKGTKTFPPEIISSMVLTKMKEIAEAYLGGKVHSAVITVPAYFNDSORQATKDAGTITGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKXGAGGKENVLPDLGGGTFDVSILTIEDGDFEVKSTAGDTLGGGEDFNRMVSHLAEFEFKRKHKIDGPNKRAVRRLRTACERAKRTLSSSTQASIEIDSLYEGVDFTYSITRAFPEELNADLFROTLPEVKALRDAKLDKGQIQEIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFFNGKELNKSINPDEAVAYGAOVAAILIGDKSENVDQLLLDVTPLSLGIEITAGGVMTPLIKRNTTIPKTQOTPTFTYSDNQSSVLVQVVEGERAMTKDNNLKGFLDGTGPPAPRGVPVQIEVTDFDANGILNVTAADKSTGKENKIITITNDKGRLSKDDIDRMVQEAEKYSEAEANDRVAARNALESYTYNIKQTVDEKLKRGKISQDKNKILDKQCEVINWLDNRMQMAEKDEYEHKQKELERVCPNISKLYQGGGPGGSGGGSGGAGGPTTEVD	
MW:69977.870 Digest Matches (Score: 113.03) Score = 113.030000, Rank = 5, Database = SwissProt, Accesskey = HSP72_HUMAN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore R(min) Range Sequence MSMS 380 830.350 1659.895 4321800.000 2+ -122.037 9228 113 36.900 173 - 188 IINEPTAAAIYGLDK MSMS 4411077.650 3231.522 1728628.000 3+ -181.661 17 13 40.000 605 - 639 VCNPIISKLYQGGPGGSGGGSGGSGAGSGPTIEEVD 2: Carbamidomethyl (C) Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4 K1C14_HUMAN MTTCSQQTSSSSSGSGSIOGGIGGSSSRISVSLAQQCKRAPSITVYGGGLSVSSSRPSSGGAGCLOGGYGGGSSSSSGSGSGGGYGGGLGAGLOGGGGGAGGQDGLVGSEKVTMQLNDRLASYLDKVRALAEHATLSEKIDRWYQRPAEIKDYSYPFKTIEDLRNKLITATVDNANVLQIDNARLAADDPTFKTYETELNLRMSVEADINGLRRVLDLTLARADLEMQIESLKEELAYLAKNHEEEMALROQVGGDVNVMDAAPGVDLSRLINEMRQDYEMAEKNRKNDAEWEFTKTEELNREVATNSELVSGSKSEISELRTMQLNEIELQSQLSMKASLNSLEETKGRYCMQLAQIQEMIIGSVVEQLAQLRCMEQONQYKILLVDVTRLEQEIATYRRLLEGDEHLSSSGSGSGSRSDRTSSRSQIRTKVNDVHGDKVYSTBEQVLRN	
MW:51529.380 Digest Matches (Score: 101.08) Score = 101.080000, Rank = 6, Database = SwissProt, Accesskey = K1C14_HUMAN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore R(min) Range Sequence MSMS 84 545.700 1090.531 3135162.000 2+ -126.876 273 61 22.500 117 - 125 VTQMNLNDR MSMS 176 651.300 1301.658 702858.000 2+ -50.412 4100 70 27.700 135 - 146 ALEEANADLEVK Keratin, type I cytoskeletal 13 OS=Homo sapiens GN=KRT13 PE=1 SV=4 K1C13_HUMAN NSLRLLSSSSAYSGGGGSGQLGGGRGVSTCTRFVSGGAGGYGGGVSGCGGGAGSGFGGGYGGGLGGYGGGLGGGFGGFGAGFVDFPGACDGGLLTGNKITYMQLNDRLASYLEKVRALAEANADLEVKIRIDWLRQSPASPERDVSYPVYITDELRDKLITATIEENNVLIEDNARLAADDPTFKTYETELNLRMSVEADINGLRRVLDLTLSKTDLEMQIESLNEELAYMKKNHEEENKFSNVQVVGQVNVMDATPGILDITRVLAENHGYEAMERNRDAEZEWFMTKSAELNKEYSTWMTIQTYSKTEITELRRTLQGLELELQGLSHWKAQLENTVAETCRYALQQLQQLIGLISSEIAQLSELSEMEQONQYKMLLDIRTRLEQEIATYRRLLEGDEHLMIGFPSSAGSVSPRSYSTVTTSSASVTTSSNAGSRRTSDVRRP	
MW:49657.380 Digest Matches (Score: 98.14) Score = 98.140000, Rank = 7, Database = SwissProt, Accesskey = K1C13_HUMAN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore R(min) Range Sequence MSMS 233 601.350 1201.617 1272099.000 2+ 62.968 526 57 30.500 202 - 212 QSVADINGLR MSMS 176 651.300 1301.658 702858.000 2+ -50.412 4100 70 27.700 124 - 135 ALEEANADLEVK Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KRT6B PE=1 SV=5 K2C6B_HUMAN NASTSTTTRSHSSSRGRGASARLPGVSRGSGFISVSRSGSGGLGACCGAGFGSRLSYGLGSGSRISIGGSGSCAISGGYSGRAGGSYGFGGAGSGFGFGGAGIYFGLGGGALAGGFGPGFVPCVPPGGIYQEVTVNQSLTPLLNLQIDPAIRVRAEEREQIKTLNNKFASPIDKVRFLFEQQNOVLQTKWELLQEGQTKTVQNLELPEFYQINLNRDLQNVIGERGRLDSERLNNQDLVEDLKNKYDEINKRTAAENEFVTLKDQVDAAYHKNVEIQAQADTITDEINFLRALYDAELSQMOTHISDTSVLSMDNNRNLDDLSIIAEVKAQYEEIAQRSEAEASWYQTKYEEQLITAGRHDGDLNRTKQIEAEINRMIOQLRSEIDHVKQCANLQAIIADAEQRGEHALDARKNLELDEGALQKQQLARLLEYQELMNVKALADVEIATYRKLLEGECECRMGSQDSSNVTVSVTSSTISSNVASKAAPGGSGGRGSSGGGYSSGSGGLGGGSGSYSGSLGVGGGGSSSGRATGGGLSVSGGSSSTIKYTTSSSSRSKXKH	
MW:60030.290 Digest Matches (Score: 90.03) Score = 90.030000, Rank = 8, Database = SwissProt, Accesskey = K2C6B_HUMAN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore R(min) Range Sequence MSMS 209 590.260 1179.600 4711418.000 2+ -74.390 788 90 29.200 360 - 369 YEELOITAGR MSMS 411 834.340 1667.767 544256.000 2+ -56.386 22 10 38.500 41 - 59 SRGSGGLGACGAGGAGFGRS 11: Carbamidomethyl (C) Thrombospondin type-1 domain-containing protein 7A OS=Homo sapiens GN=THSD7A PE=1 SV=4 THS7A_HUMAN MLGQARRNASSGSRGAAPRRVQLPLPLPLPLLLLLLRPLAGRAAQAQGEAEAPTYLVMTQGPWKKMKDCEGPGGIGQTRAVVLCRIEVEGWTTLHTNCQQAERPNNQCNCFKVCUDWHKELYDNRLGPWNQCQPVISKSLKFLKICIKREGIYVREIACIQDKDIPAEIDIICEYFEPKLLQOACILPCQDQIVSEFSAWSECSTKCSGLQHRTHRVVAPPQFGSGCPNLTEFQVQCSSPCEAEELRYSLHVGPVSTCFMPSHSVQVRQARRGKNKEREKDRSGVKVQPEARELKKKNNRNNQRNQRNENKYWDIQIGYQTRVEMCINKTKKAADLSFCQQRKLPMTFQSCVITKECQVSEWSEWSPCSKTCHDMVSPAGTRVTRTIRIQPFIQSEKECFEPEEKEPCLSQGDGVVPCATYQWRTTETWETECRVDPDLSSQDKRRNGQNTALCGGIGQTRREVYCVANENLLSLGTHNKNKASKPMDLKCTGPIPTNTTQLCHIPCPTCEVSPWSAWGPTCYENCNDQOQKRGKLRKRRTITNEPTGGSVYQNCNPHLEALICEEPACTYDKNWAKVLGNCEPDNGKGCQCPGTQVQEVWCINSODGEVDRQLCRDAITPIPVACDAPCPKDCVLTSTWSGSHSCSKTTEGKQIRARSLIAYAGEBGLCPNNSAQLQEVASCNEHCTCYVHWQTPWQCIEDTYSVSSWPTTWNCEASCSVGQVTRVYICVRVNVQVQVGGFKPESLRFETVVRPCLLPCKKDCIVTPTYSWVTSQPSCKEKGSSIRKQSRVRIIQLPANGQRODCTDPLYEKACAEAQACQYSRWKTKRWRRQLKVPWSQVQDKEQCGGVYQAMACDYQNGRLVETSRNCSHGYLEEACIIPCSDCKLSEWSNWSRCSKSGSGSVKRSKWLREKPYNGGRPCPKLDHVNQAQVVEVVPCHDCNQQLVNVTFEWCNNWSDCIIPEKGVLEVLGMVQSGDKEQCGGVYQAMACDYQNGRLVETSRNCSHGYLEEACIIPCSDCKLSEWSNWSRCSKSGSGSVKRSKWLREKPYNGGRPCPKLDHVNQAQVVEVVPCHDCNQQLVNVTFEWSICKRTPVNNRNECNGEGVQTKVRCKMQMTADGPESEHVEDYLCDEPEMLGSRVKCLPCPEDVCVISEWGPWTQCVLPNCQSSFRQRSADPIRQPADEGRSCPNAVEKEPCNLKNKNCYHYDNTDWTSCQLSEKAVCGNCIKTRMLQVRSDDGSDVLYCEALGLXNMWNTSCWYCEPVPVNCQDMSWSESCQTCCLTGKMTIRRTVTPQFGDGRPCFLMDQSKPCPKVCRWQYTGQNSFCVQEAQCEGTRTRISCVVSDGSDADPFSVDEEFCADIELIDGNKNVLYEESCPQPCQCYLKDMSWLSQLCTVNGDELDQGGIYQSRSPVITQELNQLDPEQMLETXKCYDQCYEYKMAASAMWGSRTVYMQNSDGLNVTTGGCLVMSQPDADSDCNPCCSQPHSYCESTKTCHEGEYTVMSNSTLEQCTLIPVVVLPITMEDKRDVKRTSRAVHTQPPSNPAGRGRTNFIQPFQDGRKLTWVYQVAAAGAVLLIFIVSMIYLACKPKPKPQRRQNNRKLPLTLAYDGADAM	
MW:185241.020 Digest Matches (Score: 65.19) Score = 65.190000, Rank = 9, Database = SwissProt, Accesskey = THS7A_HUMAN Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore R(min) Range Sequence MSMS 106 575.270 1149.495 3811848.000 2+ 32.574 72 48 23.700 1116 - 1125 ENCGEGVQTR 3: Carbamidomethyl (C) MSMS 105 383.930 1149.495 280647.000 3+ 243.916 47 27 23.600 1116 - 1125 ENCGEGVQTR 3: Carbamidomethyl (C) MSMS 353 737.970 2212.104 11383054.000 3+ -94.100 24 28 35.700 752 - 769 CPESLRPETVVRPCLLPCK 1: Carbamidomethyl (C) 13: Carbamidomethyl (C) 17: Carbamidomethyl (C) MSMS 383 738.100 2212.104 6380698.000 3+ -39.829 44 19 37.100 752 - 769 CPESLRPETVVRPCLLPCK 1: Carbamidomethyl (C) 13: Carbamidomethyl (C) 17: Carbamidomethyl (C) MSMS 484 738.140 2212.104 560924.000 3+ 136.554 44 18 43.400 752 - 769 CPESLRPETVVRPCLLPCK 1: Carbamidomethyl (C) 13: Carbamidomethyl (C) 17: Carbamidomethyl (C) MSMS 487 814.400 2441.040 1086265.000 3+ 59.713 15 19 43.700 1343 - 1363 WQYGGWSPFCQVQEAQCGEGTR	
Keratin, type I cytoskeletal 24 OS=Homo sapiens GN=KRT24 PE=1 SV=1 K1C24_HUMAN MSCSSRASSRAGSSSARVSSAGSSSFSSGSRCLGSGRQAGFRGQASSCSLGGSGSAGFGSGGGPGSGSVGGGPGGASGSGTGFGGGGSGFGVSGFGRGSGFCGSGSRFSSGATGGFYSYGGMGGCVGDDGLFSGGEKQTMQLNDRLANLYDKVRALAEENADLENKIKEWYDKYQSGSDGGSGRDYSKYYSIIEDLRNQIATVTVENAGIILHIDNARLAADDFTLRKYENELCLRQSVADINGLRKVLDDLTMTSRDLEMQIESFTEELAYLRKNHEEEMALROQVGGDVNVMDAAPGVDLSRLINEMRQDYEMAEKNRKNDAEWEFTKTEELNREVATNSELVSGSKSEISELRTMQLNEIELQSQLSMKASLNSLEETKGRYCMQLAQIQEMIIGSVVEQLAQLRCMEQONQYKILLVDVTRLEQEIATYRRLLEGDEHLSSSGSGSGSRSDRTSSRSQIRTKVNDVHGDKVYSTBEQVLRN	
MW:55053.440 Digest Matches (Score: 57.99)	



Spectrum Analysis Report	
Date: 10/11/2011 Time: 13:58	
FileName: H:\Bruker-II_F-disk\Stephie\080429\Stephie_Probe48_BC4_01_857.d\Stephie_Probe48_BC4_01_857.mgf	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 239 654.900 1963.011 1323165.000 3+ -165.726 13 17 30.600 1 - 19 MLLDAGQPQFPAIGVGSFAR 1: Oxidation (M)	
MSMS 203 654.910 1963.011 11048927.000 3+ -150.435 18 54 28.900 1 - 19 MLLDAGPQFPAIGVGSFAR 1: Oxidation (M)	
MSMS 203 654.910 1963.011 11048927.000 3+ -150.435 18 26 28.900 1 - 19 MLLDAGPQFPAIGVGSFAR 1: Oxidation (M)	
MSMS 369 654.920 1963.011 802628.000 3+ -135.145 48 23 36.400 1 - 19 MLLDAGPQFPAIGVGSFAR 1: Oxidation (M)	
MSMS 154 654.990 1963.011 137150544.000 3+ -28.111 22 41 26.100 1 - 19 MLLDAGPQFPAIGVGSFAR 1: Oxidation (M)	
MSMS 210 982.210 1963.011 1077740.000 2+ 204.955 24 19 29.200 1 - 19 MLLDAGQPQFPAIGVGSFAR 1: Oxidation (M)	
Uncharacterized protein C11orf57 OS=Homo sapiens GN=C11orf57 PE=1 SV=2 CK057_HUMAN	
MSRIFLQKVLNVNIRTDARNKIQEESDNRKIRELEKQHEDAYRQTRKRLPSSSSRRSDGDEESQNTYWRKNEISQTEDDFLKAKSWNKFFDYENPNPDRWCHSGYKELYPEEFETSDQDDITNGKKTSPQVKSSTHESRKHKSKSKSKKHKQKRSKKEATDITADSSSEFSSEETGASGTGKQKQPHRRKKRSKRSKSLKKPALFLAESNTSHSDDSASSSSSESEERDTKKTKRKKREKKHSTSVANNEIQTRNTRTNWKVATDERSAESSEDD	
MW:34089.220	
Digest Matches (Score: 44.88)	
Score = 44.880000, Rank = 18, Database = SwissProt, Accesskey = CK057_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 21 607.760 1214.547 207132.000 2+ -28.241 47 44 18.300 39 - 48 DMEDAYRGTK 2: Oxidation (M)	
HEAT repeat-containing protein 5B OS=Homo sapiens GN=HEATR5B PE=1 SV=2 HTR5B_HUMAN	
MELAHLILLNEELAQTITAKRPVFIFEWLRFDLKVLVAANKTDVKEKQKRLVQELTGLISSSPGPTRKLLAKNLAALYSIGDTFTVFQTLDKCNDIIRNKDDTAALVPTKLAACVAGAFYEKMGRLGSAPFETVNNLLKSLKSAESQSRISLMSLQKVLVSLGLGGAASSHRDIYKNARSLDTRSMAYRCVAKACCLLELQNEAVFMWTALENIATLCFKALENSNYGVRVAVSKLLGTVMATALMPKQATVMRQNVKRTATFDEVLEIMATGFLRGSGFLKSGGEMLKVGSGVNRVVGVTQAYVVFVTTLGGQWLETSFATFLSHVLVDVSHPRATQTHVEAVYSRRCVSFLLRATVGSLLGEKAQIAAAKEICQAIQKQMKAVEAVVNDTSGENKSGAADIAASQHVHVVCALQELGSLVQSNATASPLIQEASIGLEIVTSVLHPHSMARLAAMKRCVAVALFPQLTFLDRCAERLNNLKTSPEAVSGYSFAMAALLGGVHQCPGLIPHAKGMVVSIADILLRTAAQNSRLSLSQRTQAWLLLAGLMTLQGVVVYHYLPMKLLHWRNFPFRLSKLEBAKXAGDSFTQVTVLGGAGALCMRSFVHPCPELLTEDEVTRKMTPIECAMTMHSHIPSVHKABGHLKASAAVRLRYDLALLPFTTYEGSPNALLLRELVAEPTLTDNSANTTTLSRLSLCHVDSDVLLGSWLQETDHSLEDQLQPNASGSGALEBHDPSIYLIRIPAGEAVDGPLPLGVSVIDASVALPGVVFPFHVSYKRRQLMDHFAECVQKAGVGRQAOVLNIFTAVLSALKLAENKSTLQPEEVKRKSAITLVNMPDLNPNPILRCAAGALGRMAQVVGAEATFIARMAQYSFDKLKSARDVVSRTHGSHLALGCLHRYVGGIGSQHCLKTSVSI1LLALAQDQTSPEVQGTWSLSHALIVDSSGPMYRGVYEPITLSLVLTLTLVPPSHTEVHQCLGRCLGAIITTVGPQLQNGATTSTIRSSCLVGCAITQDHSDSLVAQAASICQLQHMFPAPRHVNLSSVPSLCVHLCSHLLLLRRAAVACLRQLAQREAAECVEYAMSLAKNTGDKBESSANVSPFAPGVSSRTDHCRRQGVNITETGLEGLLPQMLDRETRDKLCSDDIHDTLGHMLSSLAVEKLSHWMLCKDVLAASSDMSTATLLSSGKDEAEKKDEMDDTMTFTTLEEDKSKPFVPAFWATRVRVARDCLCRINLCENADQAHFDLALARSALKANFTDOLLVHLHSLIRWAFMAATDSNOLRNAGLQALEDIKKFASVPEPEPFQHVILEQVQANVGAAIRFAPSQDTPSDIIARACQVCSVWISGVVSLDNDLRVRVHNLVSLDKVQAGKSGSSQLVRESATTMEKLAVLKAWARVYVVMANNIKKEAESKPKRAIKNTDDDDDCQITDELPPDSLITLVQPELPTLSRLMLAALKDVALLTLPAPFSSQLPPDGGAFYTPETIDTARLHYRNSWAPLIIHAVALMLNSNGTPTCSESTEEAAISGLQKRSTSVNLNQASGAVGSAKSLPEINKORMHLILGVSIQFLCSRPREEPIEHVTACIQLALHTLDSPYARVHIAEDQLIGVELLSVHLRLLLTNWPSIVQLLVTVGVVQIVRAAADVLYQKRNLTNEDMEKEACTVLGEGGDSGGLIPGKSLVFATMELLNMPILVRHMPHLSTKVS DSPSHIATKTRLSEESARLVAATVTILSDPLSLCSPAGCMTILPTILPLIARILIKWNPSSKSDNQVPPVPVSAALQGIKSVTLTSMKATEAGVQKQWALTIRSTLACILEYSQPEDSVPTPEVSMLTALALFLWSASNEIIGVQSLQNCMNRFKNALNSCDPWQAKCYQLLSSVFOHSNRALSTPYIHS LAPTIVVEKLAVERNRNPASNTIELLAGVGGIKVLETLVALGEEQNRVQLLALVPTLISYLLDENSFASASSASDKLHEFALQNLHIGPLYHAFKFTVMGAAPELKVRLETAVRASQASKAKAARQAPAIHSAPTIKLKTSPF	
MW:224159.350	
Digest Matches (Score: 44.78)	
Score = 44.780000, Rank = 19, Database = SwissProt, Accesskey = HTR5B_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 247 672.260 672.404 920699.000 1+ -214.280 38 13 30.900 373 - 379 AQIAAAK	
MSMS 255 609.340 1217.725 1470490.000 2+ -43.143 116 44 31.400 32 - 42 FLDKVLVAANK	
MSMS 167 612.510 1835.880 866243.000 3+ -198.872 85 30 27.100 398 - 404 QMKAVEAVVNDTSGENK 2: Oxidation (M)	
MSMS 391 766.960 2299.033 5803340.000 3+ -73.045 6 20 37.500 637 - 656 LMTPIECAMTMMSHPSVMK 9: Oxidation (M) 11: Oxidation (M) 12: Oxidation (M)	
Monocarboxylate transporter 11 OS=Homo sapiens GN=SLC16A11 PE=2 SV=1 MOT11_HUMAN	
MPAPQRKRRRGFSRRCPTPTQTAMTPQAPGPPDGGWGVVAAAFAINGLSYGLLRSLGLAFPDLAHFDRSAQDTAWISALALAVQQAASPVGSALSTRWGARPVVMVGGVSLASLGFVFSAPASDILLHLVGLGLLLAGFGWALVFAPALQTLRSYFSRRRVLA VGLALTNGASLLLAPALQILLDTFPQWRGALLLGAITLHLTPCGALLPLVLPGDPPAPRSPPLAALGLSLFTRRAFSIFALGTALVGGGYFPVYVHLAPHALDRGLGYYGALVYVAAAMGDAGARIVCGWLAQQGWPLPRLLAVFGALTGLGLWVVGVLVPPVVGGEESWGPLLAAAVAYLSAGSYAPLVFGVPLGLVGVGGVQATGLVHMLSLGGLLGPFLSGFLRDETQDTGSFLLSGSLILLSGSEYITGLPRALPSCGSPAPPTAPPTPEGELLFAPQAVLLSPGGPQSLDTTC	
MW:47760.500	
Digest Matches (Score: 44.45)	
Score = 44.450000, Rank = 20, Database = SwissProt, Accesskey = MOT11_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 239 654.900 1963.007 1323165.000 3+ -163.673 17 18 30.600 273 - 294 GLGGYGAAALVVAAMGDAGAR 16: Oxidation (M)	
MSMS 203 654.910 1963.007 11048927.000 3+ -148.382 11 26 28.900 273 - 294 GLGGYGAAALVVAAMGDAGAR 16: Oxidation (M)	
MSMS 369 654.920 1963.007 802628.000 3+ -133.092 42 40 36.400 273 - 294 GLGGYGAAALVVAAMGDAGAR 16: Oxidation (M)	
MSMS 154 654.990 1963.007 137150544.000 3+ -26.058 15 34 26.100 273 - 294 GLGGYGAAALVVAAMGDAGAR 16: Oxidation (M)	

Abbildung 8-11: Mascot-Report für Histon H2B. Aufgeführt ist hier eine Liste experimenteller Daten der ersten zehn identifizierten Proteine der Probe, wobei Histon H2B das erste spezifisch identifizierte Protein darstellte.

[illegible]

Spectrum Analysis Report

Date: 10/14/2011 Time: 11:34

FileName: H:\Franken\100519\Stephie_Probe1_BD1_01_7284\Stephie_Probe1_BD1_01_7284.mgf

MEPLKVEKFATAKRNGLRVAITPLRPGELLFRSDPLAYTVCKGSRGVVCDRCLLGKEKLMRCQCRVAKYCSAKCQKAWPDHKKRECKLCKCKPRYPFSDSVRLLRGVVFKLMDGAPSESEKLYSPYDLESINKLTE
DKKEGLRLQVMTFOHPMREI1QDASQLPFAFDLFEAFKVICNSPTICNAEMQEVGVGLYPSISLLNHSDCPNCSIVFNGPHLLLRVDRDIEVGELTICYLDMIMTSEERRKQLRDQVCFCEDCFCRCQTQDKDADML
TDEQVYVKEVQBSLKKTEELRAHWKEVQLAMCQAISSNSERLPDINIYQLKVLDCANDACINLGLLEALFYGTRTMEPRIFPFGSGFVRGVQVVRKVGKLQHQGMFPQAMNRLAFIDMRVTHGRHSLIEDL
ILLLEECDAIRKAS

MW:49064.570

Digest Matches (Score: 36.78)

Score = 36.780000, Rank = 6, Database = SwissProt, Accesskey = SMYD3_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.3.01.241, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 583 648.429 648.313 32283.000 1+ 178.613 1 5 31.200 46 - 51 GVVCDDR
MSMS 86 610.362 1828.956 56991.000 3+ 63.129 4 36 21.300 376 - 391 VGKLLQHQGMFPQAMK 10: Oxidation (M)
MSMS 86 610.362 1828.956 56991.000 3+ 63.129 2 15 21.300 376 - 391 VGKLLQHQGMFPQAMK 15: Oxidation (M)

Histone H2B type 1-A OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BA PE=1 SV=3 H2B1A_HUMAN

MEPVSFKGATISKGKFKAVTKQKQKGGKRRKRKESYSIYIYKVLQVHPDITGSSKAMINNSFVDTIPERIASASRLAHYSKRSTISSREIQTAVRLLLPGLAKHAVSEGTKAVTKYTSSK

MW:14158.740

Digest Matches (Score: 36.25)

Score = 36.250000, Rank = 7, Database = SwissProt, Accesskey = H2B1A_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.3.01.241, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 449 477.289 953.603 74718.000 2+ -33.844 5 11 28.400 102 - 110 LLLPGLAK
MSMS 407 477.338 953.603 1030258.000 2+ 69.032 143 36 27.500 102 - 110 LLLPGLAK
MSMS 373 477.353 953.603 1030258.000 2+ 100.525 26 29 27.000 102 - 110 LLLPGLAK
MSMS 586 889.019 1776.830 287466.000 2+ 113.307 69 10 31.300 60 - 74 AMSIMNSFVTDIFER 2: Oxidation (M)
MSMS 571 593.063 1776.830 117159.000 3+ 194.241 38 26 30.900 60 - 74 AMSIMNSFVTDIFER 2: Oxidation (M)
MSMS 571 593.063 1776.830 117159.000 3+ 194.241 38 21 30.900 60 - 74 AMSIMNSFVTDIFER 5: Oxidation (M)

Apollipoprotein L5 OS=Homo sapiens GN=APOL5 PE=1 SV=1 APOL5_HUMAN

NPCGRQNLQVGRVRLPGLDELNLAQHWIVANVEYLGTEGVEQVRLVNMVTYIQLKLAARQDRNFWVTS GAHKTVNLLGAROTVWLLGSLALASLAESQCRKISELNVENLMLILHEVLLSKRLTAELLRL
LVASSSGAVGWNVLGSLALAPVTAAGAGLMLSGTGLGAAAITNIVTVLENSNSAARDAKSLRGLPTTSHAEPGINWSEIEAAGFCVNVKCVKAIQCIGKDLHAYQMAKNSGFMAMVKNFVAKRHIPFWTARGV
QRAFEGTTLAMTNGAWMVAAGAGGLMLKMDSSFLQSWKHLEDGARTETAELRALAKLEQELDRLTQHRHLLPKQASQTCSSSRGAVRGRSVVKPEGRSPLPWFVVEHQPRLPGVALRTPKRTVASPRMLGHQ
PAPPAPARKRQAQGRHRQ

MW:47013.990

Digest Matches (Score: 33.85)

Score = 33.850000, Rank = 8, Database = SwissProt, Accesskey = APOL5_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.3.01.241, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 587 604.934 1812.725 136671.000 3+ 33.802 4 14 33.500 85 - 100 CDKDSMPDGNLSEEEK 6: Oxidation (M)
MSMS 102 605.046 1812.726 310094.000 3+ 219.261 23 15 21.700 85 - 100 CDKDSMPDGNLSEEEK 6: Oxidation (M)
MSMS 124 605.066 1812.726 310094.000 3+ 252.379 139 33 22.300 85 - 100 CDKDSMPDGNLSEEEK 6: Oxidation (M)

Serine/threonine-protein kinase Nek10 OS=Homo sapiens GN=NEK10 PE=2 SV=2 NEK10_HUMAN

NPDQDKRVYTERKSTDKQEIITTRDYSDLKRLCILLNVQSSRQQLPAINFPSDAQNSHTKSEPAIRAGGHRARGQWHSTEAULENFVSINYKNERNFSKHPQRKLQFIPTALVKNNLISREWVNRAPSIHFLKRLVIC
LRLMLRDCVQELILSLPGLDELNLAQHWIVANVEYLGTEGVEQVRLVNMVTYIQLKLAARQDRNFWVTS GAHKTVNLLGAROTVWLLGSLALASLAESQCRKISELNVENLMLILHEVLLSKRLTAELLRL
LCAEPQVEQVLYEGTPIVLLSLHSDMLKLLMSIVNMLVQVCEDEPSTSEIRIRWGIQRLHLILQGDNRNFSVDHSSIQGLSSANAAGRIQQLHLSDELSPREIQENTPFSLQAACCAALTELVLNDNTNAHQVYVQENGCV
YITAKLILPMKQNAKSNLLQCFAYRALRFLFSMERNRPLFKRLPPTDLFEIFDIIGHVYRDISAYEELVSKNLNLVDEDELQIAENIESINQNAKPLKYIGNYAILDLHLSGAGFACQVYKVRKHSQGNLAKMKEVNL
HNPAFGKKDKDRDSVRNIVSELTITIKQQLYHPNIVRYTTFLENDRILYVNMELLEGAPLGEHFSLSKEHHHTFEERLWKIFIQJCLCLALRYLHKEKRIVHRDLTPNNIMLGDKDKVTVADPGLAKQKQENSKLTSVV
GTLILSEPEVLKSEPYGEGADNVAVGCLILQMATLSPPFYTNMLSLAKTIVEAVYEPVPEGIYSKRYVDTISRLCTPDABEARPDIVEVSMISDVMMKYLNDLSTQSLSEKLEBERRRRTQRYVMEARNRTVTCHH
ELAVLHSHTEPKASLSSSSAAASLSLSEADLPPEQFQASVGRKDRACDELIDQDNFLNBAKRTVEVDEDLISDNSSSSSSPLKESTFNILKRSFSASGGERQSGTRDPTGGTGRPRFALLPLDLLLK
VPRMLRAHIEIEAELVGVGWSGLPAVILRLNLDKHPQWCTFLVWSAGLAVSRKVRGDISQPTQIILQLHKIITYTQLPAPLHNNLRKRVIERPKRSLFSQGSNPNCLSKTSIKLQSGSEPEIFENPFTADYHL
LHRSOGSNLSPPNPTDGLTPSTIELEEGTIEYQMQTVIEVLEUESGYNTSNRYSHPWGTKNHPFKR

MW:133145.620

Digest Matches (Score: 32.70)

Score = 32.700000, Rank = 9, Database = SwissProt, Accesskey = NEK10_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.3.01.241, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 407 477.338 953.614 1030258.000 2+ 57.243 40 27 27.500 420 - 427 LILPNKQK
MSMS 373 477.353 953.614 1030258.000 2+ 88.735 34 29 27.000 420 - 427 LILPNKQK
MSMS 204 805.808 1610.827 52208.000 2+ -135.690 11 4 23.900 790 - 803 YLDNLSTSLSEK
MSMS 213 901.863 2703.483 209390.000 3+ 33.918 16 32 24.100 978 - 1001 EIEAELVTGWGSHSLPAVILRLNK

Tenascin OS=Homo sapiens GN=TNC PE=1 SV=3 TENA_HUMAN

NGAMTQLLAGVFLAFLALATAGGVLKKVIHRKQSGVNATLPEENQPVFVNHVYNIKLPVGSQCSVDLESASGEKDLAPPPSEPSFEQHTVDGENQIVFTHRINIPRACGCAAPDVKLELRLSELEENLVYSLRE
QCTAGAGCCLQFATGRGLDTRFCGSGKGNFTGECQCVCEPGWRGPNCSPEFCPGNCLRGRICIDGDTGCEGDSQLACPSDCMDQGRKCVNGVCI CFBGLAGADCSREICFPVCSREEGTGVDGLVCVCHDFAG
DDCNKPLCLANVYGRKCVENECVSDCFPGCEDESLICPDICFDGRGCTINFTCYCEGFTGECQDPTPHACHTPGCEGQCVCEGEPAGQVCEGCEKPAQCHNRRGCVDGRCDCDGTGADCGELKCPWQCSG
BGRVCVNGQCEGDEGTYGDCDSQLRCPNDCBSRGRCEGKVCCEQFKFYGDCSDMSCPNDCBQHRGCVNMGMCVDDGTYGECDRDQCPRDCSNRGLCDVQGCVCDEGDTGPDCAELSCPNDCBQHRGCVNMGVCVCEG
FMGDKCKBQRCFSDCHQGRVCDVQGCICHEGFTGLDCQHGSCSPDCNNLQDCVSGRCCINEGYSGEDCESEVSPKDLVVTEVTETVNLAWDNEMRVTEYLVTYPTTBEGGLEMEAFPRVFGDGTSTIQLEPEQVEYFI
RVFAILEKNKSIIPVARSVATYLPAPGELKFKSIKETSVEVEWDPDIDAFETWEIIFRNNKDEDEGEITKSLRRPETSRYRQTGLAPQGEYIESLHIVKNNTRPGGLKRVTTTRLDAFSQIEVQKDVDTPTTALITWFKPLA
EIDGIELTVQIKDVPGDRITLDLEQDNQVSIQNLKPDTEYEVSLISRGDMDSNPAKETPTTGLDAPRNLKRVSDTNSITLEWRNGRAADISYRIKAPISGGDHAEVDVPHSQOATRTTTLTGLRPTTEYGLGVG
AVKDEKSNPATINAAETLITPQDEQVSETAETSLILAKTKPLARFORYNLVSLPQGVQVGLPRMTTYSYLVGLEPQGEYVLLFAEGRHHSKPARVRASTPQAPLENLVTTEVWGDLRLNWTADQAYEHF
IIQVEAKNVAAARNLTVPGSLRAVIDPLGKAATPYTYSIVGIQGYRTPVLSAEASTGECTPNLGEVVVAEVBWDALKLNWTAPEGAYEYFFIQVQAEADTVEAAQNLTVPGGLRSTDLPLGLKAATHYITITRGVTQDF
STTPLSVEVLTEEVPMGNLTVTEVSGWALRLNWTTPDGTVDQPTIQVQEAADQVEEAHNLTVPGSLRSMELPGLRAGTPTVTYVTLHGEVGRHSTRPLAVEVVTEDLPQGLDVAESVQWGDGLRLNWTADNAYEHFVIQ
VQEVNKEVAQNLTPLGSLRAVIDPGLGAAATPYRYSIVGIRGYRTPVLSAEASTAKEPEIGNLVNSDITPESPNLSWMATDGIFFETPTIEIIDSNNRLLETVEYNISGAERTAHISGLDLPSTDFIYVLSGLAPSIRTK
TISATATTEALPLENTTISDINPYGFTVSWMASENAPDSFLVTVVDSGKLLDPQFTLSTGRKLELRLGITGQYEVMMVSGFTYGHQTKPLRAEIVTEAPEVVDNLLVSDATPDGFRLSWTADREGVDFNPFVKLRID
TKQSGEPLEITLILAPETDITPQDEQVSETAETSLILAKTKPLARFORYNLVSLPQGVQVGLPRMTTYSYLVGLEPQGEYVLLFAEGRHHSKPARVRASTPQAPLENLVTTEVWGDLRLNWTADQAYEHF
FTALDQPSGLVTANIDSEALARWAPAIATVDSYVISYTGKEVPEITRTVSGNTVEYALTDLEPATETYLIRIAPKRGQKSSITITAKFTTDLSDPRDLTATEVQSETALLTWRPFRASVYGYLLLVYESVDGTKEVI
VGPDTTYSLSLSDSPSHYTKAIQALNGLRNSNIQITPTTIGLLYPPKDCSQAMLNGDITTSGLTYLTYLNGDKAEALVFCMDTSDGGGVIVFLRRKNGRNFYQNWKAYAAGFGDRREEFWGLDNLNKITAQGGY
ELRVLDLRDHGETAFAPVADYFSGVQAKTRYKLKVBEGYSGTAGDSMAYHNHGRSFSTFDKDTDSAITNCALSYKGAFWYRNCNRVNMCMRGYDNNHSGQVNWFWHKGHEHSIQFAEMKLPSNFRNLEGRKKRA

MW:240700.150

Digest Matches (Score: 32.47)

Score = 32.470000, Rank = 10, Database = SwissProt, Accesskey = TENA_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000 Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version: 2.3.01.241, DB: SwissProt, DB Version: SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 705 802.373 1603.793 61835.000 2+ -33.890 11 1 33.800 11 - 125 ACGCAAPDVKELLSR
MSMS 517 592.982 1776.651 53188.000 3+ 157.951 18 24 29.600 392 - 407 CECDDGFTGADCGELK 1: Carbamidomethyl (C) 3: Carbamidomethyl (C)
MSMS 586 889.019 1776.651 287466.000 2+ 213.861 17 13 31.300 392 - 407 CECDDGFTGADCGELK 1: Carbamidomethyl (C) 3: Carbamidomethyl (C)
MSMS 571 593.063 1776.651 117159.000 3+ 294.803 70 33 30.900 392 - 407 CECDDGFTGADCGELK 1: Carbamidomethyl (C) 3: Carbamidomethyl (C)
MSMS 9251063.010 2164.793 63552.000 2+ 101.717 5 - 37.900 356 - 375 CEEGQVCDEGAFGVDCSEK 1: Carbamidomethyl (C)
MSMS 930 846.914 2539.307 73755.000 3+ -228.433 13 9 38.000 1742 - 1765 ITVPITGGTFSMTVYDGTKTQTR 13: Oxidation (M)

Histone H2B type 1-C/EF/GI OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BC PE=1 SV=4 H2B1C_HUMAN

MEPEKASAPAPKSGSKVATKAQKQKGGKRRKRKESYSYVYVVKVLQVHPDITGSSKAMINNSFVNDIPERIAEASRLAHYKRNSTITSREIQTAVRLLLPGLAKHAVSEGTKAVTKYTSSK

MW:13897.560

Digest Matches (Score: 112.24)

Score = 112.243333, Rank = 1, Database = SwissProt, Accesskey = H2B1C_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.: 1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 449 477.289 953.603 74718.000 2+ -33.844 5 11 28.400 101 - 109 LLLPGLAK
MSMS 407 477.338 953.603 1030258.000 2+ 69.032 143 36 27.500 101 - 109 LLLPGLAK



FileName: H:\Franken\100519\Stephie_Probe1_BD1_01_7284.d\Stephie_Probe1_BD1_01_7284.mgf

DOI: 10.1002/for

Spectrum Analysis Report

Date: 10/14/2011 Time: 11:34

FileName: H:\Franken\100519\Stephie_Probe1_BD1_01_7284.d\Stephie_Probe1_BD1_01_7284.mgf

Digest Matches (Score: 33.85)

Score = 33.850000, Rank = 8, Database = SwissProt, Accesskey = APOL5_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 587 604.934 1812.726 136671.000 3+ 33.802 4 14 33.500 85 - 100 CDKDSMPDGNLSEEEK 6: Oxidation (M)

MSMS 102 605.046 1812.726 310094.000 3+ 219.261 23 15 21.700 85 - 100 CDKDSMPDGNLSEEEK 6: Oxidation (M)

MSMS 124 605.066 1812.726 310094.000 3+ 252.379 139 33 22.300 85 - 100 CDKDSMPDGNLSEEEK 6: Oxidation (M)

Serine/threonine-protein kinase Nek10 OS=Homo sapiens GN=NEK10 PE=2 SV=2 NEK10_HUMAN

MPDQDKKVTTEKSTDDKQQTITTRDYSDLRLRLCLLNVOSSRQQLPAINFDSAQNSHTKSEPAIRAGGHRARGQWHESTEAVELENSFYNKYERNFNRKHPQRKLPQIIFTALVKNRLISREWNVRAPSIHFLKRVLLIC
LRLLRDRVCYOEILHSJGIEINLAQIWEIVANETLCTGEEQHTVDKLVNMTVTFQKLAARVQDRNFWVTTSGAKHTVNLGLGARDTVNLGSLALASLAESQCREKISELIVENLMLILHEYDILLSKRLTAELLRL
LCAEPQVKEQVLYEGPIPVLLSLHSDHLKLLNSVNLVQVCEDDPETSVEIRIWGGIQLQLHLGLQDRNFVSDHSSISGLSSANAGRIQQLHLSEDLSPREIQENTPFSLQAACCAALTELVLNDNTNAHVQVQENGCV
YTIAKLILPNKQKNAKSNLQCYAFRALRFLFSMERNRPLFKRLPPTDLFEIFIDIGHVVRDISAYEELVSKLNLVDEDELQIAENIESINQNKAPLKVIYGNAILDLHLSGAFQCVYKVRKHSQGNLAMLMEKVNIL
HNPAFGKDKKDRSDSVNRNIVSELTIKEQLYHPNIVRYRYTKFLENDRLYIVMELIEGAPLGEHFPSSLKEKHHHTTEERLWKIFIQLCLALRYLHKEKRIVHRDLTPNNIMLGDKDKVTVDPLGAKQKQENSKLTSVV
GTILYSCPEVLKSEPIYGEKADVNAGVCLIQMATLSPPFPSTNMLSLATKIVEAVTEPVPEGIYSEKVTDTISRCLTPDAEARPOIVEVSMISDVNMKYLNDLSTQSLSEKLEKBERRRRTQRYPMANRRNTVTCHH
ELAVLSHETPEKASLSSSSGSAASLSELSADLPPGFQFASYGKDDRACDEILDONFLNENAKOTYSRVDDELISDNSSSSSSFLKSTPNILKRSFSASGEQRSGTDRFTGTGSRPRPALPLDLLLK
VPPHMLRAHKEIEARLVGWQSHSLPAVILRNLLKHGPMQOTPLMQASAGIAVSQRKVRQISDPTIQIQLIQLHKIYITITQLPPALHNNLKRRIERFKSLFSQQSNPCNLKSEIKLSQSGSEPIEPNPFPTADYHL
LHRSSGNSLSFNDPTGLPTSTIELEEGITYEQMQTVIEEVLEESGYNFTSNRYHSTYPWGTKNHPTKR

MW:131145.620

Digest Matches (Score: 32.70)

Score = 32.700000, Rank = 9, Database = SwissProt, Accesskey = NEK10_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 407 477.338 953.614 1030258.000 2+ 57.243 40 27 27.500 420 - 427 LILPNKQK

MSMS 373 477.353 953.614 1030258.000 2+ 88.735 34 29 27.000 420 - 427 LILPNKQK

MSMS 204 805.808 1610.827 52208.000 2+ -135.690 11 4 23.900 790 - 803 YLDNLSLQSLSEK

MSMS 213 901.863 2703.483 209390.000 3+ 33.918 16 32 24.100 978 - 1001 EIEAELTVGWQSHSLPAVILRNLL

Tenascin OS=Homo sapiens GN=TNC PE=1 SV=3 TENA_HUMAN

NGAMTQLLAGVFLAFLALATEGGVLKKVIRHKRQSGVNATLPEENQPVFNVHVNLIKLPVGSQCSVDLESASGEKDLAPPSEPSSEFQHTVDGENQIVFTHRINIPRAACGCAAPDVKELLRLSELEENLVSSLRE
QCTAGAGCCLQJATGRDLTRPFCSGRGNFSTEGCCVCEPGWRGPNCSSEPCPGNCLHGRCLDGGCLCDDGFTGEDCSQLACPSDCNDGKRCVNGVCICFBGIAGADCSREICFPVCSSEHGTCVVDGLCVCHDGFAG
DDCKNPLCLANQYRNGKRVENECVDOEPFGCESELICPMDCFDGRGCTINFTCYEEGFTGEDCKPCTPHACHTPGRCBGGCCVCEGPAQVCSSEKRPACCHNRCVGDGRCECDGFTGADCGELKCPWQCSG
HGRVCVNGQCVCEGTYGEDCSQLCRPNDCBSRGRCEVGKVCCEGFKGYDCSDMSCPNDCBQHRGRCVNGMCCVDDGYTGECDCRDRQCPDRDCSNRGLCVDGQCVCEGDPGTGPDCAELSCPNDCBQGRVCVNGQCVCEG
FMGDKCEQRCPDSYDCHQGRVCDGQCICHEGFTGLDCGQHSCEPDCNNLQGCVSRCICNBYSGEDCESEVSPPKDLVVTVEETVNLAWDNEMRVTEYLVVYTPTHEGGLEMOFRVFGDQGTSTIIQELFEGVEFYI
RVFAILENNKSIIPVSARVATYLPAPEGELKFKSIKETSEVEVWDPLDIAFETWEIIFRNNKDEDEGITSRLRRPETSRYRQTGLAPQGEYEISLHIVNNRTRGPGKLRVTTLRDAPSQIEVKDVTDTTALITWFKPLA
EIDGIELTVYIKDVPGDRITLDEEDENQVSIQNLKPDTEYEVLSISRGDMSSNFAKETFTTGLDAPNLRKRVSYOTDMSITLEWRNGRAALDSYRIKFIAPISGGDHAEDVPHSQQAATTKTTLTLRPGTEYGLQVS
AVKEDKEBNPATINAETLDTPKOLOVSETAETSLZLLAKTPLAKFORYLNLVSLPGQWGVQLPFRMTTSYVLNGLFEGEYVNLVFAEKGHHKSPARVRASTFQAPELNLVTVTEWQDGLRLNWTADQAYEZH
IIQVQEAANKVEAARNLTVPGSLRAVDIPGLKAATPYTTSYIYGVQGYRTPVLSAEASTGETPNLGEVVAEVGWDALKLNWTAPEGAYEFFIQVQEAQDTVEAQNLTVPQGLRSTDLPLGLKAATHYITIRGVTDQF
STTPLSEVLTEEVPMGNLTVTEVSWDALRLNWTTPDGTYDQFTQVQEAQVQEAHNLTVPGSLRSMELIPLRAGTFPYTTLHGEVGRHSTRPLAVEVVTEDLPQLGDGLAVSEVGWGLRLNWTAAADNAYEHFVIQ
VQEVNKEVEAQNLTLPQSLRAVDIPGLEAATPYRVSIYGVIRGYRTPVLSAEASTAKEPELIGNLVNSDIIPESPNLSWMATDGIFFETPTIEIIDSNNRLETVEYNISGAERTAHISGLPPSTDFIVYLSGLAPSIRTK
TISATATTEALPFLLENTISDINPGFTVSWMASENAPDSFLVTVVDSGKLLDPQEPFLSGTQRKLELRLGLITGIGYEVWVSGFTYGBQTKPLRAEIVTEAEPEVDNLLVSDATPDGFRLSWTADGVPDFVLRKIRD
TKQSGSEPLETLTLAGPEPDTITGLREATEYIELGYISGRGRQTVSALATWMSKEVIFSDITENSAVSWRAPTAQVESRITTVTVTSQGPQWVTVDCQTKPTPLVKLIPGVYELVSIANKPESESPVSGS
FTTALDGPSSLVNTIYDSEALARWQPAIAIVDSYVISYTGKVPETIRTVSGNTVEYALTDLEPATEYTLRIFAEKGPKQKSTITAKFTTDLSDPRDLTATEVQSELTALLTWRPFRASVTGYLLVYESVQGTVEVI
VGPDTTSSYSLADLSPSPTHYAKIQALNGLRNSNMIIQTFITTLGLYPPPKDCSQAMLNGDITSGLYTIIYNGDKAEALVEFCDMTSDGGGWIVFLRRKNKGRNFPYQNKAYAGFGDRREEFWGLDNLNKITAQGGY
ELRVDLRLDHGETAFAYVDKFSVGDAKTRYLKEVGYSGTAGDSMAYHNHGRSFSTFDKDDTSAITNCALSYGAFWYRNCHRVNLMGRYVGNHSGQVNVFWHKGHEHSIQFAEMKLRSNFRNLEGRKKRA

MW:240700.150

Digest Matches (Score: 32.47)

Score = 32.470000, Rank = 10, Database = SwissProt, Accesskey = TENA_HUMAN

Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 705 802.373 1603.793 61835.000 2+ -33.890 11 1 33.800 110 - 125 ACGCAAPDVKELLSR

MSMS 517 592.982 1776.651 53188.000 3+ 157.951 18 24 29.600 392 - 407 CECDGFTGADCGELK 1: Carbamidomethyl (C) 3: Carbamidomethyl (C)

MSMS 586 889.019 1776.651 287466.000 2+ 213.861 17 13 31.300 392 - 407 CECDGFTGADCGELK 1: Carbamidomethyl (C) 3: Carbamidomethyl (C)

MSMS 571 593.063 1776.651 117159.000 3+ 294.803 70 33 30.900 392 - 407 CECDGFTGADCGELK 1: Carbamidomethyl (C) 3: Carbamidomethyl (C)

MSMS 925 1063.010 2164.793 63552.000 2+ 101.717 5 - 37.900 356 - 375 CEEGQCVCDEGFAGVDCSEK 1: Carbamidomethyl (C)


MSMS 930 846.914 2539.307 73755.000 3+ -228.433 13 8 38.000 1742 - 1765 IYVPITGGTFSMTVDTGKTQTR 13: Oxidation (M)



Spectrum Analysis Report									
Date: 10/11/2011 Time: 13:08									
FileName: H:\Franken\100519\Stephie_Probe3_BD3_01_7290.d\Stephie_Probe3_BD3_01_7290.mgf									
Score = 36.180000, Rank = 5, Database = SwissProt, Accesskey = CCD43_HUMAN									
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta									
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore R(min) Range Sequence									
MSMS 327 886.818 2689.231 143294.000 3+ -294 497 32 36 25.000 1 - 29 MAAPSEVAAIAPEGEGGGGGFGSWLDGR									
Peroxidasin homolog OS=Homo sapiens GN=PXDN PE=1 SV=2 PXDN_HUMAN									
MAKRSRGGRGCLLALVLCAGWTLAVAGKFGACGSPSLCFRTTVRCMHLLLEAVPAQVPTSLDLRLFNRIREIQGAFRRRLNNLTLLNNNQIKRIPSGAFEDLENLKYLYLYKNEIQSIDRQAFKGLASLEQ									
LYLHFNQIETLDPDSFOHLPKLERLFLHNNRITHLVPGTFNHLESMKRLRLDSNTLHCDCEILWLADLLKTYAESGNAQAAACEYPRRIQGRSVATITPEELNCERPRITSEPDQADVTSNGTVVTFCTRAEAGNPKPE									
I IWLRRNNNELSMKTRDLRLNDDGLMIQNTQETDQGIYQCAKNVAVGEVKTQEVTLRVFGSPARPTFVIQPTQNTVELVGVESVTECSATGHPPPRIISWTRGDRTPLPVDPRVNIITPSOGLYIQNVVQDGSSEYACSA									
TNNIDSVHATAFIIVQALPQFVTVPQDVRVIEGGTVDFQCEAKGNPPFIWARTKGGSQLSVDRRHVLSSGTLRISGVALHDQDQTECAQVNIIGSKRVVAHLTVQPKVTFVFASIPSDTTVEVGANQLPCSSSQGEP									
FPAITWNKDVQVTECKTHISIEGLTINDVGPADAGRYECVARNITGGSASVSMVLSVNVDFVSRNGDPFVATSIIEATVORAIMSTRHLDFDSRRSPNDOLLALFKYPRDPPYVEQARAGEIFERTLOLIQEHV									
QHGLMYDLNQTSHYHNDLVFSQYLNLIANLSCCTAHRHRVNNCSDMCFHQRYRTHDQTCNNLQHPMGWASITAFERLLKSVYENGFTPRGINPHRLVNGHALMPRLVSTTLIGETVTPDQPTBMLMQWQGLDHD									
LDSTVVALSQARFSDGQHCNSVNSNDPPCFVSMIPNDRSARSGARCMFVSRSSPVCVSGMSTLLMNSVYPREQINQLTSYIDASNVSYSSTEHEARSIRDASHRGLLRQGIQVRSKPLLPFATGPPTECMRDENES									
PIPCFLAGDRANEGQLGSLSMHTLWFRHNRITATELLKLNPHWDGDTIYYETRRKIVGAEIQHITYQHWLPKILGEVGMRTLGEYHGYDGPINAGIFNAPATAAFRFGHTLVNPLLYRLDENFQIAQDHLPLHKAFPS									
PFRIVNEGGIDPLLRGLPFGVAGKMRVPFSQLNLTETLERLFSMAHTVALDLAANIQRGDRHGIPPTHDRYVYCNLSAHTFDLKNELKNPEIREKLRLKYGSTMLNIDLPALVVEDLVGSRIGLPTMLCLLSTQPKR									
LRDGDRLYENPQVFSQAQLTQIKTSLARILLCODNANTITVQSDVFVAEPHGYSGCEIPFVQLRVWDQCCEDCTRQGNAPSFVHFGRRSLFESYQEDKFKTKTRFKRIPSVGRQGEHLNSTSAFSTRSDAS									
GTDNFRFVLEMQKTTTIDRTQIKKLESLRSLTTECVDAGGESHANNTKKWDACITICECKDQVTCFVEACPATCAVFPVNIIGACCFCVLCQKRAEKF									
MW:165169.870									
Digest Matches (Score: 35.22)									
Score = 35.220000, Rank = 6, Database = SwissProt, Accesskey = PXDN_HUMAN									
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta									
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore R(min) Range Sequence									
MSMS 766 859.404 859.395 36469.000 1+ 10.091 3 11 32.800 875 - 880 CMFVFVR 1: Carbamidomethyl (C)									
MSMS 342 606.762 1817.843 172850.000 3+ 180.675 52 35 25.300 114 - 127 VLYLVKNEIQSIDR									
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase N2 OS=Homo sapiens GN=PTPRN2 PE=1 SV=2 PTPR2_HUMAN									
MQPFLPLLLLLLLLLLPFRVLPAAPSSVPRGRLPGRIGCLLEGLCGASEACVNDGVFGRCQKVPAMDIFYRYEVSFVALQRLVALQKLSGTFGTWDDTYQYVMDQELADLPKTYLRRPEASSPARFSKHSVGSERR									
YIREGGGAALANALRHLPLFEALASQAPASVLIARITQDRPPAEGDRFSESILTYVAHTSALTYPGSGRTQLREDLLPRTLGLQKLVDSFKVDSGVDRHLMALSAAYAQRPPAPPGGESLEPQYLRLAPSRMP									
RPLALPAAPAKWPSPLDGSDEPSTGDGARHTLKLQROQPAEVRGLSGLELDGMAELMAGLMQGVDRGVARGSPGRAALGESGEQADGPKATLRGDSFFDDGVQDDDRLYQEVHRLSATLGGLLQDHSRLLPGA									
LPPARFLDMERRKSHSEPSLSSEETAGVENVKSTYTKDLLGQDHPSEGAAPGELQNMQPGPSKEQSLPAGAQALSDGLQLEVPQSEEEARGYIVTDROPFLRPEEGRRLVEARILLQVPSAFADVEVLGP									
AVTFKYSANQNTVTEOVEKAVTQNKLETSGLKILQTVGSKSKFLPQABGEDSTFKITALTIVSLACILGVLLASGLTYCLRHSSQRLKELKSLGDDPGADATAYQELCKQRMAITPPDRPGHPSRI									
SVSSQFSDGPIFSPSARSSASSNSWEEPVQSNMDISTGMIILSYMEDHLKNNKRLKEWEALCAYAQEPNSFVAQREENVPKNRSALVITYDHSRVLKKAENSHSHSDYINASPIIMDHPRNPAYIATQGPLPATVA									
DFWQHNVSESPVSMVLTPLANGVQCYBYHNPDEGSNLHYIYEVNLSHIEWCEDFLVRSFYLKNLQTNTRTQVTFHLSWYDRGVPSSRSLLDFRRKVNKCRGRSCPIIVHCSDGAGSGTYYLIDMLVMKMA									
KAGEKIDIAATLEHRLDQRPQMVQTEQFEFALTAVAAEVNAILKALPQ									
MW:111202.070									
Digest Matches (Score: 34.45)									
Score = 34.450000, Rank = 7, Database = SwissProt, Accesskey = PTPR2_HUMAN									
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta									
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore R(min) Range Sequence									
MSMS 361 962.195 2885.305 571594.000 3+ -254.632 14 34 25.700 37 - 63 LGCLLEEGLCGASEACVNDGVFGRCQK 3: Carbamidomethyl (C) 25: Carbamidomethyl (C)									
MSMS 361 962.195 2885.305 571594.000 3+ -254.632 19 32 25.700 37 - 63 LGCLLEEGLCGASEACVNDGVFGRCQK 10: Carbamidomethyl (C) 25: Carbamidomethyl (C)									
MSMS 361 962.195 2885.305 571594.000 3+ -254.632 21 27 25.700 37 - 63 LGCLLEEGLCGASEACVNDGVFGRCQK 16: Carbamidomethyl (C) 25: Carbamidomethyl (C)									
MSMS 361 962.195 2885.305 571594.000 3+ -254.632 16 18 25.700 37 - 63 LGCLLEEGLCGASEACVNDGVFGRCQK 3: Carbamidomethyl (C) 16: Carbamidomethyl (C)									
MSMS 361 962.195 2885.305 571594.000 3+ -254.632 16 13 25.700 37 - 63 LGCLLEEGLCGASEACVNDGVFGRCQK 3: Carbamidomethyl (C) 10: Carbamidomethyl (C)									
Uncharacterized protein FLJ39653 OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 YD020_HUMAN									
MQPCQAVPQSGRLRGSSRGPSRSGPGMAAAGGSAVEPRGCGRHHRCQPSARCPAVRSGLPLQTRCPBCAGAAQVIALLARPRRNGPSRSPPTPSAGCAPCLFWFHLFCIFMLACYIPWPLSVLWQFPFKHKGKEL									
LQPNHNRWAGCEGPPRDGSPDRGSLPQAGAGGLSTLSPGTGVRRQLPATTVSLCLRCFTWNTSPFQLWRVTTPRQAWCRDHRQLGRWERRCPRLGEGGNLFPAPQIVARSGETGVTPFPVCGLRDSAVLLCLFD									
MW:29535.180									
Digest Matches (Score: 34.11)									
Score = 34.110000, Rank = 8, Database = SwissProt, Accesskey = YD020_HUMAN									
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta									
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore R(min) Range Sequence									
MSMS 350 338.217 675.390 100465.000 2+ 55.003 15 11 25.500 13 - 18 LRGSSR									
MSMS 238 618.938 1854.888 92474.000 3+ -47.510 35 34 23.800 19 - 38 CPGQSGPGPMMAAAGGSAVEPR 9: Oxidation (M)									
LONG PALATE, LUNG AND NASAL EPITHELIUM CARCINOMA-ASSOCIATED PROTEIN 3 OS=HOMO SAPIENS GN=LPUNC3 PE=1 SV=2 LPLC3_HUMAN									
MQPVMALWSLLLMGLATPCQELLETYGLARIDKDELGAIQNSLVGEPIQLQNVLSGVTAVNRRGLGSGGLGGGLGGGLGHGGVFGVVEELSGLKEELTLPKVLLKLLPGFGVQLSLHTKVMHCSGPIGLGLQLA									
AEVNVTSRVALAVSSRGTPILILKRCSTLGHISLFSGLLPTPLFGVVEQMLFKVLPGLLCPVVDVSVLGVNVLGAVLGLVSLGALGSVEFSLATPLISNOYIELDINPIVKSIVAGDIIDFPKSRAPAKVPPKKDH									
TSQVHVPVLYLPMFTTFPGLLQNTGALDMDITFELVPSDVPLTTDOLAALLPEALGKLPLHQQLLFLRVREAPTVTLHNKALVSLPANIHVLFYVFGKTPESLFEIENSVMTVRAQLPASATKLHLSLSLERLSVKVASS									
FTFAFDGSRLEEWLSHVGVAVYAPKLNVALDVGIPLPKVLINFNFSVLEIVENAVVLTVAS									
Digest Matches (Score: 33.89)									
Score = 33.890000, Rank = 9, Database = SwissProt, Accesskey = LPLC3_HUMAN									
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta									
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore R(min) Range Sequence									
MSMS 353 581.391 1161.615 182910.000 2+ 137.605 7 33 25.500 253 - 263 SVAGDIIDFPK									
Golgi SNAP receptor complex member 1 OS=Homo sapiens GN=GOSR1 PE=1 SV=1 GOSR1_HUMAN									
NAAGTSSYWDLRKQARLENELDKLYSFSLKCTSYSHSTRDGRDRYSSDTTPLLNGSSQDRMFETAIEIQLLARLTGVNDKMAEYTNAGVPSLNALMHTLQRRHDIQDYTEHFHKTKANFMAIRERENI									
NGSVKRDIESYKSGGVNRRRTFLFKHDHRLNRSDLIETTSIAMATEKNMTSQRGHLKSHSKMNTLANRFPVNSLIQRINLRRRRDSLILGGVIGICTTILLLYAFH									
MW:28594.590									
Digest Matches (Score: 29.09)									
Score = 29.090000, Rank = 10, Database = SwissProt, Accesskey = GOSR1_HUMAN									
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine:Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta									
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore R(min) Range Sequence									
MSMS 214 923.464 2768.372 190745.000 3+ 2.016 78 29 23.200 88 - 112 MAEYTNAGVPSLNALMHTLQRRH									



Page -5-

Spectrum Analysis Report	
Date: 10/11/2011 Time: 13:04	
FileName: H:\Franken\100519\Stephie_Probe2_BD2_01_7288.d\Stephie_Probe2_BD2_01_7288.mgf	
Score = 53.030000, Rank = 4, Database = SwissProt, Accesskey = ARSA_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 532 705.467 1409.692 32410.000 2+ 166.930 5 9 28.700 85 - 87 MGMYPGVLVPSSR 1: Oxidation (M)	
MSMS 532 705.467 1409.692 32410.000 2+ 166.930 29 28.700 85 - 87 MGMYPGVLVPSSR 1: Oxidation (M)	
MSMS 758 575.394 1723.959 33965.000 3+ 121.064 39 9 33.300 98 - 114 GGLPLEEVTVAEVLAAAR	
MSMS 756 862.657 1723.959 59120.000 2+ 201.900 384 53 33.300 98 - 114 GGLPLEEVTVAEVLAAAR	
MSMS 213 785.401 2354.319 90329.000 3+ -55.495 15 5 23.300 458 - 479 QLLKLAQLDAAVTFGPSQVAAR	
Ephrin type-A receptor 3 OS=Homo sapiens GN=EPHA3 PE=1 SV=2 EPHA3_HUMAN	
MDCQLILLKSLCSVLDSFGLIPGPSNEVNLDSKIQCELGWISYPSHWEELISVDHEHTITRTYQVCNWDHSSQNNWLPFNWVPRNSAQKIIVELKFTPLADCNISPLVLTQCKETFNLYYMESDDDDHGVKFRFH	
QPTKIDITLAADESFTQMDLGDRIILKLNTEIREVGPVNNKGFYLAQDVGACVALSVSRVYFKKCPPTVKNXLANMFPDTPVMDSGSLVEVRGSCVNSKSEEDPPRMVCSSTEGEMLVPIGKCSNAGYEERGFMQACRPG	
FYKALDGNMKKCAKCPBHSSTQEDGSMNRCENNYFRADKDPSSMACTRPSSSPRNVISNINETSVIDLWSNPLDTGGRKDVTFNIIICKCGWNIKQCEPCSPNVRFLRPQFGLTNTVTYDILLAHNTYTFEIDA VNG	
VSELSSPPRQFAVASITNTQAAPSPVLTIKKDRTSRNSISLSWQEPPEHPNGIILDYEVKYVEKQEQETSYTILRARGNTVYISLKLPTDIYVFQIRARTAAGCYGTSNRKFEFETSPDSFVSI GESSQVVMIAISAAGA	
IILLTVTVTVLIGRPGCYVSKRGADERKLHFNGHGLKPLGLRTYVDPTIEDPTQAVHEFAKELDATNISIDKVVGAGEFGFVCSGRLLPKSKEISVAIKTLKVGTVPEKQRDPFLGEASIPGMDPHNIIRLEGVVTV	
KSPFVNIYVTEHNSGLDSFLKKRDAQFTYIQLVGLMRLGIASGRHLSDMGIYVHRDLAARNLILNSNLVCKVSVDFGLSRVLEDDPEAAITTRGOKIPTRWTSPEALATKRTSASDWSYGLVLEWVMSYGERPTWEM	
SNQDYKAVDEGTEALPPMDCCFPAALYQLMLDCWQDRNNRPKFEQIYVLSILDKLRNPGSLK1TTSAAARPNSLLDQSNVDITTTFRTTGDLNMGVWTAHCKEIPFGVETYSCTDIKARISITDDMKRVGVTVVGGQKII	
SSIKALETQSKNGPVPV	
MW:110060.070	
Digest Matches (Score: 35.86)	
Score = 35.860000, Rank = 5, Database = SwissProt, Accesskey = EPHA3_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 205 394.759 788.524 123565.000 2+ -16.858 15 35 23.100 984 - 970 KIISSIK	
Antigen Ki-67 OS=Homo sapiens GN=MKI67 PE=1 SV=2 KI67_HUMAN	
MMPTRHLRVITKRSVGDPHPFLSLSFCLPGRGICEDIRIQLPVVYRQCKIEIHEQEAELHNFSSNTNPTQVNGSVIDEPVRLKHGDVITIIIDRSFRYENSLQNGRKSTEFPRKIREQEPARVRSRSPSSSDFDEKAO	
DSKAYSKITGEKVSNGNQVHINKNVEDSTADDSQVAGQTTNVHSEHAGNRGNNAADISGDFKISSVKLVSRYGELKSVPVTTQCLDNSKNKNSPFWKLYESVKKELDVSKQENVLQCRKSSGLQTDYATKES	
ADGLQGETQLVLSRKSFPKSGGSHAVAEASPQDELQDNKGKGRDVEVSQTPSKAVAGSPFLYEPARKMTTPVQYSQQQNSPQKHKNKOLYTTGRRESVNLGSKSGFAGQDKTLTRKLTRNNRTPAKVDEAADSATK	
EOPQPGKRGSGSEIIVVEVKAQVLSPPAPSPRPTVPSDQRRNSCKTAPASSSKQTEVFKRGAKSGLPKSRVSISSRQDILQWICSRKSGSAEHLVAKSWADVYKLGAKQTVTVIKHGPRSNKRROR	
RPATPKPVGVREHSQSTGHANSPTCTIIIGKAHTEKVVWPAKPVYVLMNFIISNQMDKFEDLSGIAEMPTTPVKEQQLTSTCHIAISNSNLLGQKPGQGTQSGEPLLPSTSESPGNNVFSQAQNAARQSDKCSASP	
PLRQCIENRGNVAKTPRNTYKMTSLSTKTSDDTETFSKTVSTANRSGRSTEFNRMIQKLVPESKEETNTEIVEICILKRQKQATLLQORREGEKMKIERPFETTYKENIELKENDERMKMKRSRWGQKCAPMSDLTD	
LKSLPDTMLMDTARQNLQTQDHAKAPKSEKGIITKMPQSLQPEPINTPTHTKQQLKASLGKVGVEKELLAVGKFTRTSGETTHTHREPAAGDGSIRTFKESPQLDOPAAVYGMKWRTPKEAQSLIEDLAG	
AKKTTIIPCDSPQSDPVDPTPTSTQRPKRSIRKADVEGELLACNLNPSAGAKAMHTPKPSVEEKDIIIPVGTVPQKLDLTENLTOSKRRAPTPKEEAQALDITGFELQPTPGHTEAVAAGKTMPCSPSPES	
ADTPTSTRQPKTPLEKRVQKELSALKKLTQTSGETHTDKVPGGDEKSIINAFRETAQKLDPAASVVGSKRHPKTEKAQPLEDLAQLKELPQTPVCTDKPTTHEKTKIACRSQDPVDVPTTSSKQPSKRSRLRV	
DVEEPEFALRRKTPSAGAKAMHTPKPAVSGSEKNIYAFMGTVPQKLDLTENLTOSKRRAPTPKEKAQALEDLAQLKELPQTRGHTEESMTNDKTAACKVSSQDPDKNPASSKRLRLSLGKVGKELLAVGKLTQTS	
GETTHTHTPGDGKDSMKAPMESQJILDSAAISLQSGKRLQRTPKGSEVPDEDLAQLFELQTPSHTKESMTNEKTTKVSYRASQDPLVDPTTSSKQPQKRSRLKADTEEFELAPRKQTPSAGKAMHTPKPAVGEEDK	
INTFPLGTVPQKLDQPGNLPGNSRRRLQTRKEKAQALELTGFRELQPTPCDNTPTDEKTTKKLILCKSPQSDPADTPTNTKQRPKRSRLKADVEEFLAFKRLTPSAGKAMHTPKAAVGEKDIINTFVTGTVPEKLDLLG	
NLPGSKRRPQTPKEKAALDDLQAGKELQTPGHTTEESMTDDKITEVSCSPQDPVKTPTSSKRLKLSLQKVGVEELVDPVKRLQTPGTSKPTVTHRETAGDGSIKAPKESAKQMOLDANVCYGMENRWTPEEAA	
QSLDLDLAGKELQPTPTTEESMTDDKTKIACKSPPEMDPTSTFRRRPTPKGRKQIVLELSALQKLTQVTHTDKVPQGDQKGIINWPEPAKQLDPAASVVGSKRHPKTEKAQPLEDLAQLKELPQTPVCTDKPTTHEKTKIACRSQDPVDVPTTSSKQPSKRSRLRV	
KPTPTHEKTKIACRSQDPVDVPTTIFPKQSKRSRLKADVEEESLALRRKTPSVCKAMDTTPKPAAGDEKDKMAFMGTVPQKLDLTENLTOSKRRAPTPKEKAQALEDLAQLKELPQTPGTDKPTDEKTTKIACKSPQ	
PDPVTPASTQKPRKRLKADVEEELFALRRKTPSAGKAMDTPKPAVSDKEMINTFVETVPQKLDLNLGGLPSKRRQPTPKPEKALEDDLQVGFELQTPGHTTEESMTDDKITEVSCSPQPSKRSRLKADTEEFELAPRKQTPSAGKAMHTPKPAVGEEDK	
PLIVKDMKEIPDLVSKLRTQTSGETTQVTHTEPTDGSIKIAFKESPKQLDPAASVVGSRGRLRTRKEKAALDDLVDKELFSAHPGHTTEESMTIDKNTIKPCSPPPPELTDATSTSKRCPTPRKRVKEELSAVERLT	
TDLTSGQPTHTHRETAGDGSIKIPLVQKRAKKPMVTEEPESRRAPRAPEKAQPLEDLAQLKELPQTPGHTTEESMTDDKITEVSCSPQDPVKTPTSSKRLKLSLQKVGVEELVDPVKRLQTPGTSKPTVTHRETAGDGSIKAPKESAKQMOLDANVCYGMENRWTPEEAA	
KQIKALKESAKQTPAPASVVGSRPPAPRESAQLEDLAQLFELQTPGHTTEESMTDDKTKIACKSPPEMDPTSTFRRRPTPKGRKQIVLELSALQKLTQVTHTDKVPQGDQKGIINWPEPAKQLDPAASVVGSKRHPKTEKAQPLEDLAQLKELPQTPVCTDKPTTHEKTKIACRSQDPVDVPTTSSKQPSKRSRLRV	
IGSRKQPRAPKEKQVLELQLELQTPGHTTEELANGAADSPTSAPKQTPDQSGKPLKISRLVRAKPEVPQGVVSTRDQPVKSQSKNTSLPLPFRKGGGKDGSTGTGKRLCMAPAEIIVELPASKQORVAPR	
ARGKSRVPMVVRKSLRSTAKRIEPAEELNSNDMKTNEEHLQDSVPENGKISLRSRQNKTEAEQQITVEFLAERIEINNRKPKMKTSPFMDIQNPDDGARKPIPRDKVTENKCLRSARQNESSQPVKAEESG	
QAKSAVLVQKRGEGAGSDSMCLRSRRTKSPAASTLESKSQVRVTSRVKCAENPKKAEDNVCCVIEIDNIRSRHSDSEI	
MW:358473.700	
Digest Matches (Score: 35.05)	
Score = 35.050000, Rank = 6, Database = SwissProt, Accesskey = KI67_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 140 766.012 1530.741 132445.000 2+ 180.376 17 35 26.600 1044 - 1056 FTRTSGETTHTHR	
MSMS 100 996.136 1990.921 32654.000 2+ 172.809 3 14 20.500 2101 - 2118 IACKSPPPESMDTPTSTR 3: Carbamidomethyl (C) 11: Oxidation (M)	
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 OS=Homo sapiens GN=SNRPD1 PE=1 SV=1 SMD1_HUMAN	
MKLVRLKLSHETVTIELKNGTQVBGTITGDVSNMTHLKAVMTLKNRPVQLTSLIRGNIRYFILPDSLPLDTLVDVPEKVKSKREAVAGRGRGRGRGRGRGRGRGRGR	
MW:13273.360	
Digest Matches (Score: 34.03)	
Score = 34.030000, Rank = 7, Database = SwissProt, Accesskey = SMD1_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 9491144.182 2287.247 84620.000 2+ 47.917 18 34 38.100 67 - 86 YFLPDSLPLDTLVDVEPK	
Vasculin OS=Homo sapiens GN=GPBP1 PE=1 SV=1 GPBP1_HUMAN	
MAQHDPAFANLNTPTPSSSTKSLNFEKHSNFATWENTENYDNNRRHNSDGFDSAIGRPNNGMFGRKKEKNWTRHGRNGTENINHRGGYHGGSSRSRISIFHAGKSQGLHENNIPDNETGRKEDKRERKQFEADFP	
SLNIFYVEREPNNHSLAAGVMEYTPNPKSRAPMLVIRKNGTKDLQSLGFPVVGMLSPQGVKNIGTQPSYKGLVKPPAAPPTPKPQWKQSTKENYGVTSFPHSTFGVGNFNAFKSTAKNFPSNTSVKRCNENSSSD	
PVKLANQOPLTKLFRMTDKSEFLKALKARVVEEHEDESARGSEKDDQSLNNNSSTHQERDINRNDENEIPQENHNASVTSQIIRTSFTFPQTVLSSSLAEHLLKEMGWQDSDENDETCAPLDEHRE	
FQVLSBQLKNGILKNGILKNGLICDFKFGPKWNSFTFPKTTENDOTETSSDSTDDDDV	
MW:53306.930	
Digest Matches (Score: 33.30)	
Score = 33.300000, Rank = 8, Database = SwissProt, Accesskey = GPBP1_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 257 547.327 1639.749 60402.000 3+ 52.321 71 33 24.100 258 - 271 NFPSTNSVKECNR 12: Carbamidomethyl (C)	
MSMS 4991029.161 3085.307 58725.000 3+ 52.321 11 33 28.100 388 - 413 LKEMGWQDSENDDETCAPLDEHMR 25: Oxidation (M)	
Collagen alpha-1(III) chain OS=Homo sapiens GN=COL2A1 PE=1 SV=3 CO2A1_HUMAN	
MTRLGAPQTLVLLTLLVAALRCQCGQVQAGSGSCQDQGRYNDKVDWKEPCEKICVCDTGVLCDDIICEDVXDCLSPEIIPGECPCICTPLDATALASQGPQPKQKQEGPDIKDITGVKPGPPGQCPAGEGQPGRGDRG	
DKGEGAPGPGRGDRGEPQTPGNPGQPGVQPGPPGLGNGFAAGMAGGFDEKAGAGLQVGMPGMPGPRGPGPAGAPGPGQFGNPGEPGPGVSGPMGPRGPGPGPKPGKPDGDEAKGPKGAGERGPGPGQAGRG	
FPGTGLPGVGRHGYPLDGLAGGEAGAPGVKESGSPGNGSPGMPGPRGLGERGRTGPAGAGAGARNDDQPGPAGPGPVGVPAGGPGPGFAGPAGKAGEAGTPGARGPEGAGQGRGEPGTPSPGPGASGNSPGTGD	
ITPAGKGSAGAPCTIAGAPGPGPGPGPGPQCATGTPQKPGQGTGEPGAGIKGEGQPGKGEQPGAPGAPGAGECKRGARGEPGVGPIPGPGERGAPGNRGPPOQDGLAQPGKQSGGSLAGPGKMGNDPGRPG	
FGLPQPARGLTRPGDAGQKGVQPSGAPGEDGRPGPGPGQCARQGPVGMGFPDGPAGNPGPKAGEKGLPAGLGLKLPDGTGTAAGPQPGAPGAGERGEGAPGPGSGQGLPGPGPPGEGKPGDDQVQVGG	
APGLVCPGRGEPGGERGSGAPGQGLQGLRGLPCTPTGDKPAGSAGPAGPQGAQPGPLQGNPGERGAAGIAGPGRDGRGVCKGCEGAPGKDGGRGLTGPIGPPPAGANAGEKGVGPPGAPASAGAGAPGERGCTG	
PPGAPGAPGAPGADQQAGKGEQAGQKGDAGAPGQPSGAPGPGQPTGVTGPKGARGAQGPAGATGFPGAAGRVGPPGSGNCGNPPGPPGPGSGKDGPKFARGDGSPGPRAGEPTLQQAAPGEGKEGPMGDGPGS	
AEGPFGPQGLAGQRIIVGLPGQGERGFPGLPGPSGEPGQKQAGPAGSDRGGPGVGPVGLTGPAGEPGRGSGPAGDGPGRDGAAGVGDGRGRTGAVGAPGAPGPGSPGAPGTQQAAPGEGKEGAGAGQPMGSGPAG	
ARGIQQPGQPGRGDKGAGEGERGLKHRRGFTGLQGLPGPGPSGDQASGAPGSRGPPGPGVQPSGKDGANGIPGPIGPQPGRSGETGPAGPPGPNPQPGPPGPPGPGPGIDMSAFAGLGRKRGDPDLPQMYRAD	
QAAGLQRQDAEYDAEYDQIESTIRSPGSRNPARPCRDLLKCHPEWKSQDWDIDNQGCTLDAMKVFCKNETGETCYTPNFANVPRKMNWSSKSEKKEWITGFTINGGFHYSGDNLAPFANTQWFTFLRL	
LSTGGQNTYTHYKMSIAYLDEAAAGNLKXALLIQGSDNVEIAEAGNSRFTTALADGCTHRTGKWKTVIYTHSCKTSRLPTIDTAPMDIGGEGEFQVDIGVFCFL	
MW:141898.500	
Digest Matches (Score: 33.25)	
Score = 33.250000, Rank = 9, Database = SwissProt, Accesskey = CO2A1_HUMAN	
Search Parameters: MS Tol.:300.00 ppm, MSMS Tol.:1.100000Da, Enz.Trypsin, Engine: Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta	
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev.(ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence	
MSMS 402 891.837 2673.302 117287.000 3+ 72.907 26 33 26.500 1134 - 1163 GFTGLQGLPGPPGSGDQAGSAGPAGPSGPR	
Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=SPRED1 PE=1 SV=2 SPRED1_HUMAN	
MSEBTASDNDNSYARVARVVMTRDSSGGWFLGSGGLSSVTVFKVPQGEENGADFFIRGERLDRDMVLECMKKDLIYNKVTPTFHWRIDDKFGLTFQSPADARAQDRGIRRAIEDISQCCPESKNEABGAD	
 BioTools Version 3.1	
Copyright © 1999-2007 Bruker Daltonik GmbH	
Page -7-	

Spectrum Analysis Report

Date: 10/11/2011 Time: 13:04

FileName: H:\Franken\100519\Stephie_Probe2_BD2_01_7288.d\Stephie_Probe2_BD2_01_7288.mgf

DI.QANEEDSSSLVKDLHFQQTIVVTSEPYRSSNIRPSPFEDLNARRVYMQSQANQITFGQPLDIQSRSMYVQRIKSCGSLKSNRVPLKSIHVSFQDEDEIVRINPRDILIRRYADYRHPDMWKNDLERDDA
DSSIQFSKPDSSKSDYLYSCGDETKLSSPRDSVVFKTQPSLKIKKSKRRKEDGERSRCVYQERFNHEENVRGKQDADPPIKRCIYQVSCMLCAESMLYHCHSDSEGDGDFSDPCSDTSDDKFCLRWLALVALSPFIV
PCMCCTVPLRMCHRCGEACGCCGKHKAAG

MW:50444.160

Digest Matches (Score: 29.10)

Score = 29.100000, Rank = 10, Database = SwissProt, Accesskey = SPRE1_HUMAN

Search Parameters: MS Tol:300.00 ppm, MSMS Tol:1.100000Da, Enz Trypsin, Engine Mascot Version:2.3.01.241, DB:SwissProt, DB Version:SwissProt_2011_09.fasta

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. z Dev. (ppm) Score MascotScore Rt(min) Range Sequence

MSMS 291 812.501 812.535 79061.000 1+ -42.180 13 6 24.600 229 - 235 VPLKSIIR

MSMS 908 529.769 1587.541 75962.000 3+ -156.778 4 7 36.900 425 - 439 MCHRCGEACGCCGKGK 1: Oxidation (M) 2: Carbamidomethyl (C)

MSMS 257 547.327 1639.745 60402.000 3+ 135.389 65 29 24.100 274 - 288 DDADSSIQFSKPDSSK



8.1.4 Liste der Proteine aus der Untersuchung der Eluate von HDGF Strep-tag mit Bcl-2 cds und VL in der LTQ-Orbitrap

Tabelle 8-1: Liste der identifizierten Proteine aus jeweils drei biologischen Replikaten der Eluate von HDGF-Strep-tag mit Bcl-2 cds und VL mRNA. Gekennzeichnet sind neben der Proteinbezeichnung und der Uniprot ID die in der VL-Probe signifikant angereicherten Proteine sowie die Kontaminanten und die Proteine, die in beiden Proben gleichermaßen identifiziert werden konnten (keine Kontaminanten und im t-test nicht signifikant).

Kontaminante	t-test Signifikant	Peptide	Einziges Peptide	-Log t-test p-Wert	t-test Differenz	Protein Namen	Uniprot ID
+		2	2	0,549207712	-2,94778951		P00761
+		11	2	0,835139773	-0,46568044	Cytokeratin-14	P02533
+		15	0	1,31693631	-0,590761185	Cytokeratin-6A	P02538
+		1	1	0,279917098	-0,495806376		P02666
+		2	1	0,448671729	-0,425966899	Putative uncharacterized protein ALB	A6NBZ8
+		4	3	0,846542735	-1,41828537		P02769
+		13	7	0,535370601	-0,461759567	Cytokeratin-16	P08779
+		26	21	1,79273294	-0,554592133	Cytokeratin-10	P13645
+		12	2	1,233617929	-0,802002589	58 kDa cytokeratin	P13647
+		27	16	1,46319871	-0,623260498	Cytokeratin-2e	P35908
+		2	2	0,040011459	0,108090719	Beta-actin	A1E282
+		7	1	0,130011437	0,196255366	Cytokeratin-17	Q9QWL7
+		4	0	0,535217511	0,791484833	Cytokeratin-73	Q6NXH9
+		1	1	0,665587805	-2,410044352		
	+	2	2	0,12986787	0,350688299	60S ribosomal protein L1	P36578
		4	4	3,823737705	6,58659935	60S acidic ribosomal protein P2	P05387
		2	2	0,02684013	0,114751816	60S acidic ribosomal protein P0	P05388
		1	1	0,207281341	0,65457848	B(2)GCN homolog	P56537
		1	1	0,680887315	1,254874865	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	Q43390
		1	1	0,159122449	0,559679985	60S ribosomal protein L8	P62917
		1	1	0,627222794	-1,178085327	40S ribosomal protein S7	P62081
		1	1	0,587402772	0,953838348	40S ribosomal protein S2	P15880
		1	1	0,333517944	0,85825634	40S ribosomal protein S12	P25398
		2	2	0,055456027	-0,162213326	Hemidesmosomal protein 1	Q15149
+		34	33	0,29070661	0,190619787	Cytokeratin-9	P35527
	+	6	6	2,479481621	6,124124527	Histone H2B	B4DR52
	+	10	10	2,613283994	4,696397146	Hepatoma-derived growth factor	P51858
	+	3	3	3,181008003	3,35607338	Putative uncharacterized protein RPL23A	A8MU53
		2	2	0,509536072	1,124094645	40S ribosomal protein S11	P62280
	+	2	2	4,129289375	3,733919779	60S ribosomal protein L19	P84098
		2	2	0,380731134	0,894341787	60S ribosomal protein L18a	Q02543
		2	2	0,673390672	1,654894193	Histone H2A type 1	P0C0S8
	+	3	3	2,286198188	4,442492803	60S ribosomal protein L31	P62899
	+	4	4	2,665714862	3,890903473	60S ribosomal protein L26	P61254
	+	3	3	3,29100988	3,354204814	60S ribosomal protein L7	A8MY04
		2	2	0,769145935	1,321287791	CCAAT-binding transcription factor I subunit A	P67809
		1	1	0,683851022	2,304936091	cDNA FLJ78093	A8K0H3
		2	2	0,570720824	1,306927999	60S ribosomal protein L14	P50914
	+	3	3	3,620662762	6,155094147	Histone H3.3	P84243
	+	2	2	2,707096213	3,436056137	60S ribosomal protein L18	Q07020
	+	2	2	2,616636909	3,221026738	40S ribosomal protein S8	P62241
	+	4	2	2,235884992	3,88795503	Histone H1.2	P16403
		3	1	0,871422603	1,056597074	Histone H1.4	P10412
	+	4	3	2,119531806	2,735989571	Histone H1.5	P16401
	+	2	2	2,002133752	3,004191081	60S ribosomal protein L22	P35268
		1	1	0,319824979	0,844758034	60S ribosomal protein L27	P61353
		2	2	0,931905387	1,945975939	60S ribosomal protein L30	A8MYX5
		2	2	0,66987089	1,45909373	60S ribosomal protein L34	P49207
+		32	18	0,558733103	-0,314201991	67 kDa cytokeratin	P04264
	+	3	3	4,592307111	4,440872192	Nucleolar phosphoprotein B23	P06748-1
		3	3	0,804969021	2,136748314	86 kDa subunit of Ku antigen	P13010
		1	1	0,245724969	-0,378451665	40S ribosomal protein S9	P46781
		1	1	0,213073467	0,521253586	RPS16 protein	Q6IPX4
	+	2	2	4,130187449	3,545353572	60S ribosomal protein L21	P46778
		1	1	0,247525625	-0,450265884	Coiled-coil domain-containing protein 40	Q4G0X9-1
		1	1	0,375197617	0,877541542	18 kDa Alu RNA-binding protein	P37108
	+	3	3	2,35410812	4,666424751	60S ribosomal protein L7a	P62424
		1	1	0,029954271	0,146375338	23 kDa highly basic protein	P40429
		2	2	0,396721124	0,716265361	60S ribosomal protein L24	P83731
		1	1	0,110062088	0,183540344	Ally of AML-1 and LEF-1	Q86V81
		1	1	0,473548893	1,585530917	60S ribosomal protein L6	B2R4K7
		1	1	0,449763983	1,375701904	60S ribosomal protein L11	P62913-1
	+	4	4	2,183578991	3,378061295	60S ribosomal protein L13	P26373
	+	2	2	2,242342232	2,835030238	40S ribosomal protein S26	P62854
	+	8	8	3,915606721	6,007025083	60S ribosomal protein L10a	P62906
	+	4	4	3,582034394	4,839458148	60S ribosomal protein L17	P18621
	+	2	2	3,763734121	4,90167141	40S ribosomal protein S3a	P61247
	+	3	3	2,989183902	5,422154427	Histone H4	P62805
		1	1	0,542688993	1,517316182	60S ribosomal protein L27a	P46776
		1	1	0,070517977	0,312310855	60S ribosomal protein L15	P61313
	+	5	5	3,122622514	4,184467316	60S ribosomal protein L3	P39023
	+	24	24	3,976966051	8,730750084	Nucleolin	P19338
		2	2	1,137859298	1,752509435	70 kDa subunit of Ku antigen	P12956
	+	2	2	1,043601785	5,257054847	LOC728741 protein	B2RXF8

8.2 Kontrolle der Gesamt-RNA für die quantitative Real-time PCR

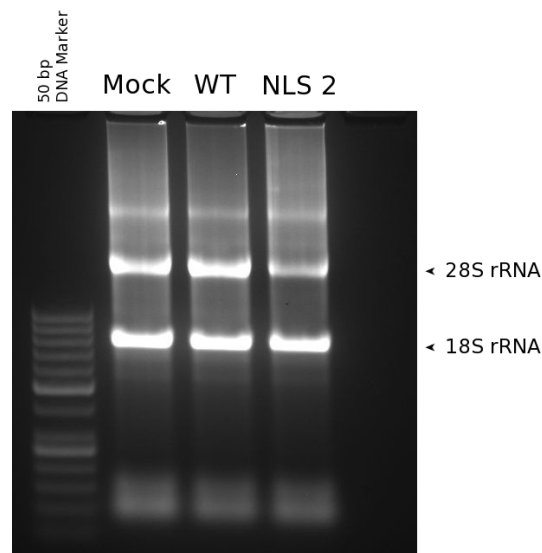
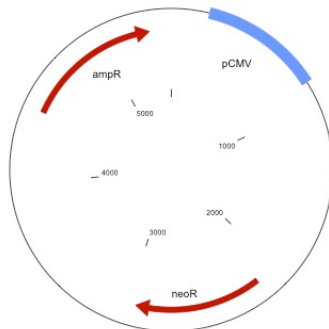


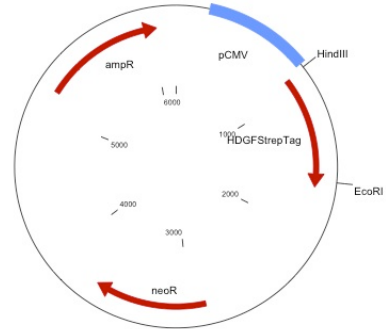
Abbildung 8-14: Analyse der Gesamt-RNA für die Real-time PCR.

Die zum Umschreiben in cDNA für die quantitative PCR verwendete Gesamt-RNA wurde im Agarosegel (2 %) untersucht. Es sind bei allen verwendeten Proben (Mock = transfizierter Leervektor, WT = murine HDGFcDNA, NLS 2 = Mutante der NLS 2-Sequenz von murinem HDGF) die beiden Banden für die ribosomale RNA zu detektieren.

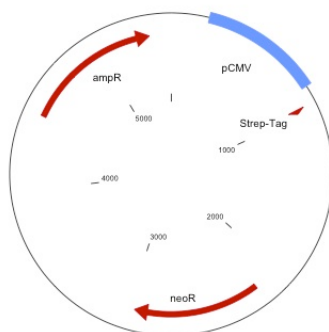
8.3 Vektorkarten



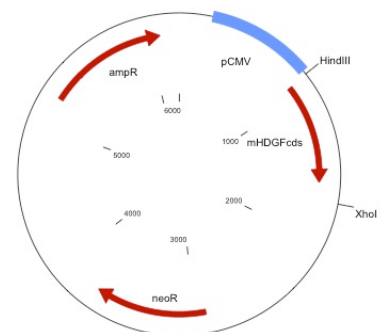
P9 pCDNA3 (6169 bp)



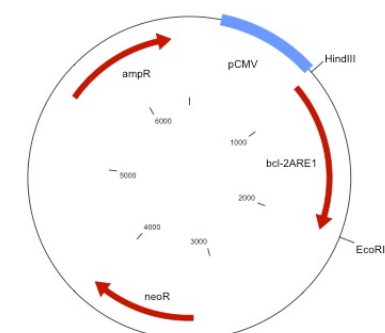
SF-32 mHDGF Strep-tag_pCDNA3 (6169 bp)



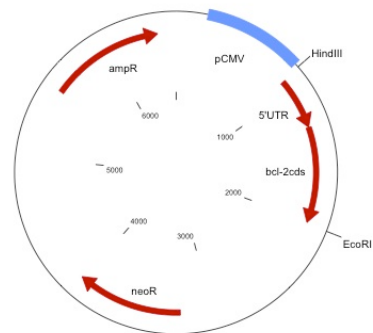
SF-48 Strep-tag_pCDNA3 (5465 bp)



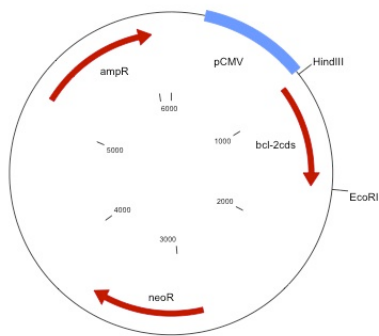
SF-274 mHDGFcds_pCDNA3 (6212 bp)



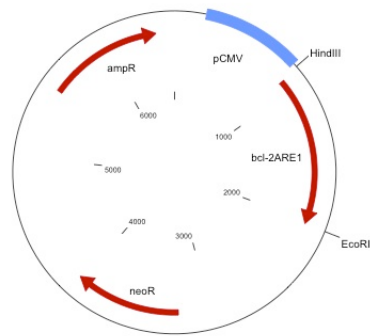
SF-627 Bcl-2cds mit ARE1_pCDNA3 (6531 bp)



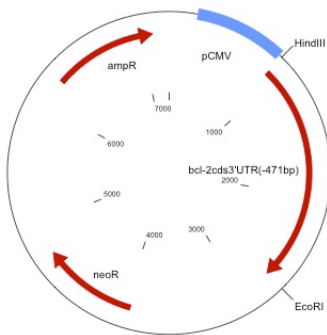
SF-639 Bcl-2cds mit 5'UTR_pCDNA3 (6527 bp)



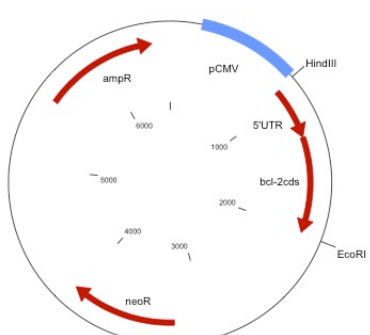
SF-626 Bcl-2 cds_pCDNA3 (6140 bp)



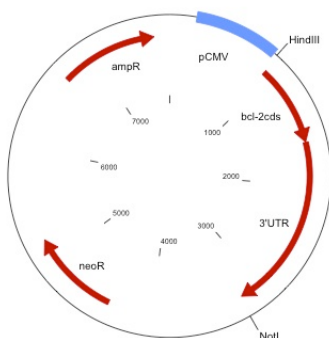
SF-627 Bcl-2cds mit ARE1_pCDNA3 (6531 bp)



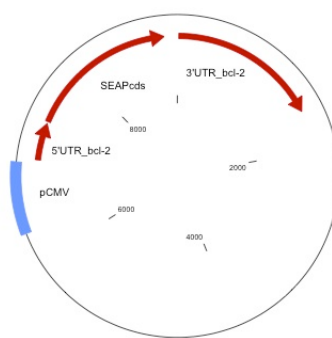
SF-628 Bcl-2 cds mit 3'UTR (-471bp)_pCDNA3 (7235 bp)



SF-639 Bcl-2 cds mit 5'UTR_pCDNA3 (6527 bp)



SF-640 Bcl-2 cds mit 3'UTR_pCDNA3 (7688 bp)



SF-643 SEAP cds mit Bcl-2 3' und 5'UTR_pCDNA3 (9077 bp)

Erklärung

An Eides statt versichere ich, dass die vorgelegte Arbeit - abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln - persönlich, selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde,

die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht sind,

die vorgelegte Arbeit oder ähnliche Arbeiten nicht bereits anderweitig als Dissertation eingereicht worden ist bzw. sind, sowie eine Erklärung über frühere Promotionsversuche und deren Resultate,

für die inhaltlich-materielle Erstellung der vorgelegten Arbeit keine fremde Hilfe, insbesondere keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen wurde sowie keinerlei Dritte vom Doktoranden unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Tätigkeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Bonn, den 17.10.2011

.....

(Stephanie Bremer)
